

DOI: 10.14427/jipai.2017.3.22

## Выделение триптазы в ротовую жидкость и активация базофилов при непереносимости стоматологических материалов

И.Ю. Карпук

УО «Витебский государственный медицинский университет»

### Allocation of a tryptase in stomatic liquid and activation of basophiles at an intolerance of stomatologic materials

I. Yu. Karpuk

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

#### Аннотация

Целью исследования явилось определение активации базофилов компонентами стоматологических материалов (КСМ) и концентрации триптазы тучных клеток (ТТК) в ротовой жидкости (РЖ) и IgE-антител в крови у пациентов с непереносимостью стоматологических материалов (НСМ).

**Материалы и методы.** Обследовали пациентов, обратившихся с жалобами на НСМ, которые были разделены на 2 группы в зависимости от временного интервала между окончанием зубопротезирования и появлением патологических симптомов: 1 группа (n=19) – от 1 до 14 суток (возникновение симптомов отмечалось сразу после протезирования, а в последующем они нарастали); 2 группа (n=18) – от полугода до 5 лет; 3 группа (n=16) – контрольная – без жалоб на НСМ. Образцы ротовой жидкости (РЖ) для измерения ТТК собирались у пациентов до снятия причинных ортопедических конструкций и через месяц после снятия. Триптазу определяли ИФА. К крови пациентов добавляли раствор солей металлов (РСМ) и раствор катионов металлов (РКМ) образцов протеза. После инкубации 15 мин определяли экспрессию CD63+CD203+ молекул базофилов, выявляемых моноклональными антителами при проточной цитометрии. В группе пациентов с НСМ и возникновением симптомов НСМ на 1-е – 14-е сутки после протезирования ТТК в РЖ выявлялась у 16 (84,2 %) пациентов до снятия причинных ортопедических конструкций, а через месяц после снятия ортопедических конструкций ТТК в РЖ не определялась ( $p \leq 0,001$ ). У пациентов контрольной группы ТТК в РЖ не определялась до и после снятия ортопедических конструкций. Таким образом, ТТК в РЖ является диагностическим маркером аллергии на КСМ. У пациентов с возникновением симптомов НСМ на 1-е – 14-е сутки после протезирования выявлены IgE-антитела к металлам. Уровень ТТК в РЖ сильно коррелировал с уровнем IgE-антител к Ni-HSA ( $R_{\text{Spearman}}=0,9; p<0,05$ ) и Cr-HSA – умеренно ( $R_{\text{Spearman}}=0,7; p<0,05$ ). Полученные данные указывают

#### Summary

The goal of the study was to determine the levels of mast cell tryptase (MCT) in whole saliva and IgE antibodies in blood in patients with intolerance to dental prosthetic materials (intolerance to dental materials – IDM) before and after removal of prosthetic constructions.

We have conducted an examination of the patients suffering from the symptoms of IDM, who were divided into 2 groups depending on the time span between the end of prosthetic treatment and the emergence of pathological symptoms: group 1 (n=19) - from 1 to 14 days (emergence of symptoms took place immediately after treatment); group 2 - (n=18) - from 6 months to 5 years, group 3 (n=16) - controls - no complaints of IDM. Whole saliva (WS) samples were collected before removal of prosthetic constructions and 1 month after. In group 1 patients we could detect salivary MCT in 16 (84,2%) subjects before removal of prosthetic constructions, and 1 month after MCT in whole saliva was not found ( $p<0,001$ ). MCT in whole saliva of control group patients was not detected both before and after removal of prosthetic constructions. Thus, mast cell tryptase in whole saliva is a diagnostic marker for intolerance to dental materials. In group 1 patients we detected IgE antibodies to Ni-HSA in 78,9% of patients, IgE antibodies to Cr-HSA in 68,4% of patients and IgE to Co-HSA in 52,6% of patients. Salivary MCT levels were in strong correlation with IgE levels to Ni-HSA ( $R_{\text{Spearman}}=0,9; p<0,05$ ) and in moderate correlation with Cr-HSA ( $R_{\text{Spearman}}=0,7; p<0,05$ ). The obtained data suggest the prevalence of immediate type reaction to dental materials. Expressed local increase of MCT level is an important diagnostic marker of local inflammatory process initiation. MCT in whole saliva was found only in 3 (16,7%) patients from group 2, the same 3 patients had IgE antibodies to metal ions in blood serum, which indicates IgE-dependent type of reaction. The rest of the patients from group 2, most likely, have a different type of allergic reaction, e. g. delayed or granulocyte-mediated.

For reliable diagnosis of allergy to the components of dental materials it is reasonable to measure salivary MCT before and

на превалирование немедленного типа реакции на КСМ. ТТК в РЖ выявлена только у 3 (16,7%) пациентов с возникновением симптомов НСМ от полугода до 5 лет (n=18), и у них же IgE-антитела к металлам в сыворотке крови. После инкубации лейкоцитов крови, пациентов с НСМ и кожной гиперчувствительностью к солям металлов, с РКМ и РСМ, при высоком уровне CD63+CD203c+ базофилов происходит снижение их количества ( $p<0,05$ ), а при изначально низком – увеличение.

Для достоверной диагностики аллергии на компоненты стоматологических материалов целесообразно измерение ТТК в РЖ до и после снятия ортопедических конструкций и оценка активации базофилов.

#### Ключевые слова

Аллергия, IgE-антитела, триптаза, тучные клетки, аппликационные пробы, стоматологические материалы.

#### Введение

Тучные клетки (ТК) являются иммунными клетками гемопоэтического происхождения. Они относятся к врожденной ветви иммунной системы и проявляют ряд морфологических и функциональных сходств с базофилами, включая общую клетку-предшественник, вырабатывающую триптазу [1]. Большинство ТК располагаются в местах взаимодействия между организмом и окружающей средой, например, коже, слизистых оболочках, которые являются идеальным местом для ТК, реагирующие на антигены и аллергены. ТК участвуют в иммунной регуляции, от начала поступления патогена до разрешения воспаления [2]. Однако наиболее заметна роль ТК в эффекторной фазе немедленных аллергических реакций: массивной дегрануляции с высвобождением накопленных медиаторов в ответ на мощный стимул, основой которого является агрегация иммуноглобулин-(Ig)-Е-несущих FcRI-рецепторов мультивалентным аллергеном, за которым следует вторая волна отсроченной секреции медиатора [3]. Триптазы тучных клеток (ТТК) представляют собой семейство трипсиноподобных сериновых протеаз, присутствующих в больших количествах в секреторных гранулах человека. Подобно химазам, другой группе сериновых протеаз ТК, триптазы являются высокоспецифичными для ТК. Обнаружение триптазы или химазы дает информацию об участии ТК, количестве активации в зависимости от клинического состояния [4].

Ранее ТТК рассматривалась главным образом как маркер либо острых аллергических реакций, либо исходного состояния тучных клеток. Согласно недавно опубликованной глобальной унифицирующей классификации расстройств

after removal of prosthetic constructions. Salivary MCT level monitoring allows to assess the role of prosthetic constructions for the emergence of IDM and need for their replacement.

#### Key words

Allergy, IgE-antibodies, tryptase, mast cells, whole saliva, dental materials.

тучных клеток, диагностическое значение определения триптазы включает: синдром активации тучных клеток, мастоцитоз, гиперплазия тучных клеток и миеломастоцитарные состояния [5].

При диагностике аллергии для выявления антител к компонентам стоматологических материалов (КСМ), связанных с лейкоцитами пациента, обычно используется прямой тест дегрануляции базофилов [6, 7].

Несмотря на внедрение в клиническую практику широкого спектра методов диагностики аллергии на КСМ, соответствующих тем или иным звеньям ее патогенеза, важной и нерешенной проблемой остается поиск новых патогенетических маркеров, сопровождающих воспалительно-деструктивные изменения в тканях при непереносимости стоматологических материалов (НСМ).

Увеличение концентрации ТТК в жидких средах организма является диагностическим маркером функционирования тучных клеток. Впервые это было обнаружено в сыворотке пациентов с анафилактическими реакциями [8]. После местной провокационной пробы уровень ТТК возрастал в назальном секрете [9], слезной [10], бронхоальвеолярной жидкости [11].

Измерение концентраций ТТК в РЖ до и после провокационного теста у пациентов с пищевой аллергией показало возможность использования ТТК в диагностических целях [6].

Таким образом, уровни исходной ТТК в биологических жидкостях дают информацию о потенциальной реакции тучных клеток, которые увеличивают риск развития аллергии. Даже уровни ТТК в пределах обычного «нормального диапазона» оказывают влияние на риск аллергии. Поэтому измерение пиковых и базовых уровней

ТТК у пациентов с НСМ является весьма актуальным.

*Цель работы:* определение концентрации ТТК в РЖ, IgE-антител и активации базофилов в крови у пациентов с симптомами с НСМ до и после удаления причинных ортопедических конструкций.

#### Материал и методы исследования

Проведено обследование 37 пациентов, обратившихся с жалобами на НСМ в клинику кафедр общей стоматологии с курсом ортопедической стоматологии клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ» в возрасте 55,7 [41; 67] года, из них 6 мужчин и 31 женщина.

Контрольную группу составили пациенты, сопоставимые по полу, возрасту, типу конструкций и количеству зубопротезных единиц, с пациентами опытной группы согласившиеся пройти обследование на наличие гиперчувствительности к зубопротезным материалам, перед плановой заменой ортопедических конструкций.

Пациенты с жалобами на НСМ были разделены на 2 группы в зависимости от временного интервала между окончанием зубопротезирования и появлением патологических симптомов:

1 группа (n=19) – от 1 до 14 суток (возникновение симптомов отмечалось сразу после протезирования, а в последующем они нарастали); медиана возраста пациентов данной группы составила 53,4 [33; 69] года, из них 3 мужчин и 16 женщин;

2 группа (n=18) – от полугода до 5 лет; медиана возраста пациентов данной группы составила 58 [51,5; 63,5] лет, из них 3 мужчин и 15 женщин;

3 группа (n=16) – контрольная – 2 мужчин и 15 женщин в возрасте 56,5 лет [45; 67] лет без жалоб на НСМ.

Все пациенты 1 и 2 групп указывали на наличие причинно-следственной связи между возникновением симптомов непереносимости зубопротезного материала и фактом контакта с ним.

Клиническими проявлениями у пациентов 1 группы были уртикарные высыпания, локальный зуд и отечность, отеки губ и щек по типу отека Квинке с выраженным нарушением самочувствия и признаками нейро-вегетативной дисрегуляции. Диагноз аллергии обосновывался клиникой и специфическим аллергологическим обследованием в условиях специализированного аллергологического отделения.

При клиническом обследовании у пациентов 2 группы диагностированы следующие локальные

объективные симптомы: контактный аллергический стоматит, локализованный гингивит, глосит, хронический рецидивирующий афтозный стоматит. Наиболее частым клиническим симптомом явился стоматит, локализованный в области причинных ортопедических конструкций.

При постановке диагноза мы имели ввиду следующие закономерности, помимо клинически видимых проявлений:

1. Быстрое обратное развитие клиники после снятия причинно-значимой ортопедической конструкции

2. Реакция на малые по протяженности ортопедические конструкции (даже на 1 коронку)

В 70% случаев у пациентов имелась связь с аллергией на металлические изделия.

Исходя из современных представлений о механизмах неблагоприятного действия стоматологических материалов на слизистую оболочку полости рта (СОПР) мы провели тщательный отбор пациентов в эту группу, исключая реакции, связанные с дисметаболизмом и функциональной недостаточностью печени, других органов желудочно-кишечного тракта и почек, имеющих иногда сходные, но по сути неаллергические проявления.

*Забор РЖ пациента.* Пациенты за сутки до забора РЖ не употребляли алкоголь, продукты с кофеином, никотин, за двое суток – противоаллергические лекарственные средства (антигистаминные, глюкокортикостероиды), исключали потенциально аллергенные продукты и напитки.

Пациент ополаскивал рот 50 мл 0,9% раствора хлорида натрия в течение 3 мин, после чего раствор выплевывал. Через 10 мин РЖ в объеме 1 мл собирали в две микропробирки, закрывали крышечкой (исходная проба №1).

Через 1 неделю после устранения причинных ортопедических конструкций, снова забирали РЖ у пациента в объеме 1 мл в микропробирки и закрывали крышечкой (проба №2).

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

Далее шприцем (5мл) забирали надосадочную часть РЖ и фильтровали в стерильную пробирку через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Все пробы РЖ после их забора хранили в жидком азоте.

*Определение триптазы* осуществляли согласно инструкции производителя тест-системы (Human TPS (Tryptase) ELISA kit, кат. номер № E-EL-H1262).

*Определение IgE-антител к металлам в сыворотке крови.*

Для выявления IgE-антител к ионам металлов мы использовали стандартную иммуноферментную тест-систему фирмы EUROIMMUN (Германия).

*Постановка аппликационных проб.*

Аппликационное алерготестирование выполняли специальными аппликаторами – IQ Ultra™ IQ-U (Chemotechnique MB Diagnostics AB Patch Test Products, Sweden) на десять лунок с внесенными в них солями металлов, согласно рекомендациям по их постановке. В качестве аллергенов были заказаны стандартные наборы, содержащие компоненты стоматологических сплавов в виде различных соединений в вазелиновой основе (Chemotechnique MB Diagnostics AB Patch Test Products, Sweden).

*Определение активации базофилов под влиянием КСМ*

Материалом для исследований являлась периферическая кровь пациентов. Забирали 2 мл крови из локтевой вены натощак в утреннее время в стерильную пробирку с гепарином (20 ед/мл).

Образцы крови пациентов 100 мкл вносили в пробирки (12x75 мм), к каждому добавляли раствор катионов металлов (РКМ), полученный после инкубации образцов стоматологических материалов в воде [12] или раствор солей металлов (РСМ) или забуференный физраствор (ЗФР) в качестве контроля.

После добавления к 100 мкл гепаринизированной цельной крови в пробирку по 2,5 мкл РКМ, РСМ или ЗФР, исследуемые образцы ресуспендировали и культивировали в течение 15 минут при 37°C в термостате. После чего добавляли 2,5 мкл раствора целевых моноклональных антител (CD203c-PE и CD63-FITC), перемешивали на вортексе и инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем добавляли раствор, лизирующий эритроциты (OptyLise С производства Beckman Coulter (США), номер по каталогу (PN A11894)), и инкубировали при температуре 37°C еще 10 мин, добавляли 500 мкл буферного раствора и фенотипировали на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC 500» («Becton Dickinson», США).

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

*Статистическая обработка* результатов исследования проводилась при помощи STATISTICA 10.0. Количественные параметры представлены в виде медианы (Me) и интерквар-

тильного интервала (LQ; UQ), где LQ – верхняя граница нижнего квартиля, UQ – нижняя граница верхнего квартиля. Для анализа различий в двух независимых группах по количественному признаку применялся непараметрический критерий U Манна-Уитни. Для анализа различий в двух зависимых группах по количественному признаку применялся критерий Вилкоксона. Для определения меры связи двух количественных параметров использовали анализ ранговой корреляции Spearman (непараметрический) с уровнем статистической значимости  $p < 0,05$ .

#### Результаты исследования

##### Определение триптазы тучных клеток в ротовой жидкости

До снятия причинных ортопедических конструкций ТТК в РЖ была обнаружена у 16 (84,2%) из 19 пациентов 1 группы (медиана – 4,76 нг/мл, диапазон 2,57-7,32, среднее  $4,64 \pm 3,11$  нг/мл), а через неделю после снятия ортопедических конструкций ТТК в РЖ была обнаружена лишь у 2 (10,5 %) пациентов в более низкой концентрации ( $p \leq 0,001$ ), а через месяц – не выявлялась (таблица 1).

Лишь у 3 (16,6 %) пациентов 2 группы ТТК была обнаружена до снятия причинных ортопедических конструкций, а через неделю после снятия – у 1 (5,5 %) пациентов. Однако результаты выявления ТТК у пациентов 2 группы достоверно не отличались от пациентов 3 группы (контрольной).

##### Аппликационные 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 Ni<sup>2+</sup>.

К Cr<sup>6+</sup> 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 Co<sup>2+</sup> у пациентов с НСМ 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.

##### Определение IgE-антител

Положительные результаты, т. е. наличие IgE-антител к Ni-HSA, в 1 группе пациентов вы-

явлены у 15 (78,9%) пациентов в ИФА, а также у 4 (22,2%) пациентов 2 группы. При обследовании сывороток крови пациентов контрольной группы IgE-антитела к Ni-HSA были выявлены у 1 (6,3%) пациента (таблица 2).

IgE-антитела к Cr-HSA в 1 группе пациентов обнаружены у 13 (68,4%) пациентов; во 2 группе пациентов – у 2 (11,1%) пациентов. У пациентов контрольной группы обнаружены IgE-антитела к Cr-HSA методом ИФА у 1 (6,3%) пациента.

Методом ИФА IgE-антитела к Co-HSA в 1 группе пациентов выявлены у 10 (52,6%) пациентов, а также у 3 (16,7%) пациентов 2 группы. В контрольной группе пациентов IgE-антитела к Co-HSA выявлены не были.

Как видно из приведенных данных, IgE-антитела к металлам в сыворотке крови у пациентов 1 группы встречались чаще, чем у пациентов других групп.

Результаты выявления IgE-антител у пациентов 1 группы с симптомами НСМ, возникшими сразу после протезирования, указывает на IgE-зависимую клиническую форму повышенной чувствительности к комплексу металл-белок.

#### Активация базофилов компонентами стоматологических материалов

PKM для исследования выбирали согласно типу причинной конструкции у пациентов.

У пациентов с НСМ обнаружено увеличение количества CD63+CD203c+ базофилов при использовании в качестве индуктора их активации РСМ и РКМ.

Медиана значений процента базофилов, экспрессирующих маркеры активации CD63+CD203c+ с РКМ, были выше тех, что наблюдались при использовании РСМ в качестве индуктора (таблица 3). Процент базофилов с РСМ был выше, чем с контрольными растворами – ЧСА, ЗФР. Уровень базофилов с последними (ЧСА, ЗФР) в опытной группе был достоверно выше, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ), что указывает на активацию базофилов при НСМ.

Прирост количества CD63+CD203c+ базофилов, после 15-минутной инкубации с РКМ и РСМ, мы объясняем тем, что в случае присутствия на клетках IgE антител и при добавлении аллергена происходит его взаимодействие со

связанными антителами в результате чего активируются базофилы [11, 12].

#### Анализ корреляции результатов

Результаты, полученные при использовании РКМ в качестве индуктора активации CD63+CD203c+, сильно и умеренно коррелировали с результатами АП с 2,5% раствором соли NiSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O через 24 часа ( $R_{\text{Spearman}} = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) и 48 ( $R_{\text{Spearman}} = 0,79$ ;  $p < 0,05$ ) часов с момента постановки. При использовании РСМ отмечена умеренная корреляция с результатами АП с 2,5% раствором соли NiSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O через 48 часов с момента постановки ( $R_{\text{Spearman}} = 0,56$ ;  $p < 0,05$ ) (таблица 4).

При постановке теста активации CD63+CD203c+базофилов с РКМ установлено наличие умеренной корреляции с результатами АП с 0,25% раствором Cr<sub>2</sub>K<sub>2</sub>O<sub>7</sub> через 24 часа ( $R_{\text{Spearman}} = 0,45$ ;  $p < 0,05$ ) и 48 ( $R_{\text{Spearman}} = 0,68$ ;  $p < 0,05$ ) часов с момента постановки, а при использовании РСМ статистически значимая умеренная корреляция выявлена с результатами АП с раствором Cr<sub>2</sub>K<sub>2</sub>O<sub>7</sub> через 48 часов с момента постановки АП ( $R_{\text{Spearman}} = 0,54$ ;  $p < 0,05$ ).

Анализ взаимосвязи результатов постановки теста активации базофилов по увеличению экспрессии CD63+CD203c+ с РКМ выявил наличие корреляции с результатами АП с 1% раствором соли CoCl<sub>2</sub>·x6H<sub>2</sub>O через 24 часа ( $R_{\text{Spearman}} = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) и 48 ( $R_{\text{Spearman}} = 0,87$ ;  $p < 0,05$ ) часов с момента постановки. С использованием РСМ, в качестве индуктора экспрессии CD63+CD203c+ статистически значимая умеренная корреляция выявлена с результатами АП с раствором соли кобальта через 48 часов с момента постановки АП ( $R_{\text{Spearman}} = 0,62$ ;  $p < 0,05$ ).

Результаты выявления IgE-антител у пациентов с НСМ указывают на IgE-зависимую клиническую форму повышенной чувствительности к КСМ.

При анализе корреляции у пациентов с НСМ уровня экспрессии CD63+CD203c+ базофилов под воздействием РКМ с уровнем IgE-антител выявлена сильная корреляция с IgE-антителами к Ni-HSA ( $R_{\text{Spearman}} = 0,82$ ;  $p < 0,05$ ) и к Co-HSA ( $R_{\text{Spearman}} = 0,87$ ;  $p < 0,05$ ); а к Cr-HSA – умеренная ( $R_{\text{Spearman}} = 0,41$ ;  $p < 0,05$ ).

Результаты корреляции теста активации базофилов с замедленными (через 48 часов) АП и немедленными IgE-зависимыми реакциями указывает на участие базофилов в этих обоих типах реакций при НСМ.

#### Обсуждение

Учитывая тот факт, что аллергия на КСМ развивается по контактному типу, изучение базофильной гиперчувствительности в ее патогенезе является весьма актуальным [12]. Кожной базофильной гиперчувствительностью называют индуцированную лимфоцитами, замедленную аллергическую реакцию с большим количеством базофильных клеток. Этот тип иммунологического реагирования участвует в патогенезе контактного дерматита и в отторжении трансплантата. Впервые она была описана Dienes (1928) как переходная стадия при сенсибилизации растворимыми белками без адъюванта Фрейнда, за которой следует антителозависимая реакция. В литературе данный тип реакций встречается с названием аллергическая реакция Джонса-Мота. Индуцировать эту реакцию могут белки и контактные аллергены. Этот тип реакции может переходить в реакцию клеточного типа. При антигенной стимуляции, помимо обычных лимфокинов, выделяется особый медиатор, оказывающий на базофилы хемотаксическое действие. Выделение этого фактора прекращается с выработкой антител, однако пока не известно почему. В некоторых случаях эта реактивность может сохраняться в течение недель и даже месяцев.

**Таблица 1. Сравнительная характеристика уровней ТТК в РЖ у пациентов до и через 1 месяц после снятия ортопедических конструкций (нг/мл)**

Группы	До снятия	Через 1 месяц после снятия
1 группа (n=19)	4,76 [2,57;7,32] *	0,0 [0,0;0,0]
2 группа (n=18)	0,0 [0,0;0,0]	0,0 [0,0;0,0]
Контрольная группа (n=16)	0,0 [0,0;0,0]	0,0 [0,0;0,0]

Примечание. \* –  $p < 0,05$  1-й группы по сравнению со 2-й и контрольной.

**Таблица 2. Частота наличия IgE-антител к металлам у пациентов**

Группы пациентов	Ni-HSA n (%)	Cr-HSA n (%)	Co-HSA n (%)
1 группа (n=19)	15 (78,9%)*	13 (68,4%)*	10 (52,6%)*
2 группа (n=18)	4 (22,2%)*	2 (11,1%)	3 (16,7%)*
3 группа (n=16)	1 (6,3%)	1 (6,3%)	0

Примечание. \* – отличие между группами с  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; \* – отличие между 1 группой с  $p < 0,05$  по сравнению со 2 группой.

**Таблица 3. Процент базофилов, экспрессирующих маркеры активации CD63+CD203c+ после стимуляции**

Группы	PKM	PCM	ЧСА	ЗФР
Опытная группа (n=22)	47,33 [29,33; 56,0]*, +	43,35 [35,79; 49,86]*, +	29,55 [19,81; 36,48]	22,54 [14,93; 30,02]
Контрольная группа (n=20)	14,43 [10,9; 19,05]	15,51 [11,2; 20,51]	17,71 [14,0; 22,57]	14,81 [13,2; 20,6]

Примечание. \* – отличие между опытной группой по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ); + – отличие между индукторами аллергенами внутри опытной группы с  $p < 0,05$ .

**Таблица 4. Корреляция (Spearman) между тестом активации CD63+CD203c+ с РКМ, РСМ и АП с солями металлов через 24 и 48 часов с момента постановки с солями металлов у пациентов исследуемой группы (n=22)**

Индукторы в тесте активации CD203c	Аппликационные пробы					
	24 часа	48 часов	24 часа	48 часов	24 часа	48 часов
	АП с NiSO4	АП с NiSO4	АП с Cr2K2O7	АП с Cr2K2O7	АП с CoCl2	АП с CoCl2
PKM	0,7*	0,79*	0,45*	0,68*	0,7*	0,87*
PCM	0,39	0,56*	0,41	0,54*	0,29	0,62*

Примечание. \* –  $p < 0,05$ .

По продолжительности данная реакция может быть отнесена к клеточно-опосредованным. В отличие от atopических реакций в этом случае наблюдается лишь незначительная дегрануляция тучных клеток. Считается, что это связано с другой формой высвобождения медиаторов, регулируемой Т-клетками.

Для пациентов с подозрением на аллергию к КСМ существует необходимость в надежных диагностических тестах, так как ложноотрицательные результаты могут подвергнуть этих людей риску возникновения аллергических реакций после зубопротезирования. АП рассматриваются как золотой стандарт тестирования на предмет аллергии и гиперчувствительности к КСМ. Однако, ложноположительные АП могут лишать пациентов возможности установки желаемых ортопедических конструкций. Таким образом, недостатки АП пробуждают интерес к поиску надежных тестов *in vitro* для подтверждения аллергии [14, 15].

Результаты диагностики гиперчувствительности и аллергии на КСМ по приросту уровня CD63<sup>+</sup>CD203c<sup>+</sup> базофилов, с РКМ и РСМ отличались. У пациентов с кожной гиперчувствительностью к КСМ, РКМ показала большую чувствительность, чем РСМ, для обнаружения металл-активированных базофилов. У пациентов с КСМ-индуцированной НСМ под воздействием обоих вариантов индукторов результаты анализа отличались от контроля ( $p < 0,05$ ). Однако РКМ в качестве индуктора активации CD63<sup>+</sup>CD203c<sup>+</sup> базофилов была более активной и специфичной, и результаты с ней наиболее сильно коррелировали с результатами АП.

Нами замечено, что чувствительность теста увеличивалась, если пациента обследовали раньше с момента снятия причинных ортопедических конструкций. Известно, что в среднем спустя 1 год после аллергической реакции уменьшается чувствительность кожных проб к аллергенам (гаптенам), а в последующем это происходит равномерно год за годом [9]. Точно не известно, есть ли различия относительно кинетики потери чувствительности к КСМ, проявляющиеся в АП и в экспрессии маркеров активации базофилов. Также можно констатировать и в отношении IgE-антител: у пациентов с потерей чувствительности по АП IgE-антитела к металлам встречались реже, чем у пациентов с положительными результатами АП (глава 4). Кроме того, показано увеличение уровней ТТК в РЖ после ОПП, у пациентов с развитием симптомов НСМ на 1-14 день после протезирования, что указывало на немедленную аллергию у них.

## Выводы

1. Установлено участие базофилов и тучных клеток в бионесовместимости стоматологических материалов. Обнаружена активация базофилов в ответ на стимуляцию РКМ и РСМ и выделение в РЖ триптазы при НСМ.

2. Доказано, что наличие триптазы тучных клеток (ТТК) в РЖ является диагностическим маркером аллергии на КСМ. В группе пациентов с НСМ на 1-е – 14-е сутки после протезирования ТТК в РЖ выявлялась у 16 (84,2 %) пациентов до снятия протезов, а через месяц после их снятия ТТК в РЖ не определялась ( $p \leq 0,001$ ). У пациентов контрольной группы ТТК в РЖ не определялась до и после снятия ортопедических конструкций.

3. Выявлено, что после инкубации лейкоцитов крови, пациентов с НСМ и кожной гиперчувствительностью к солям металлов, с РКМ и РСМ, при высоком уровне CD63<sup>+</sup>CD203c<sup>+</sup> базофилов происходит снижение их количества ( $p < 0,05$ ), а при изначально низком – увеличение. Разработан тест активации CD63<sup>+</sup>CD203c<sup>+</sup> базофилов под влиянием растворов РКМ и солей металлов, с диагностически значимыми параметрами (РКМ – чувствительность – 72,7%; специфичность – 90,5%) и РСМ (чувствительность – 64,1%).

У пациентов с НСМ и кожной гиперчувствительностью к солям металлов, повышение уровня экспрессии CD63<sup>+</sup>CD203c<sup>+</sup> базофилов под воздействием РСМ сильно коррелировало с уровнем IgE-антител к Ni-HSA ( $R_{\text{Spearman}} = 0,82$ ;  $p < 0,05$ ), Co-HSA ( $R_{\text{Spearman}} = 0,87$ ;  $p < 0,05$ ) и с Cr-HSA – умеренно ( $R_{\text{Spearman}} = 0,41$ ;  $p < 0,05$ ), а также с результатами АП с 2,5% раствором соли NiSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O ( $R_{\text{Spearman}} = 0,79$ ;  $p < 0,05$ ) и с 1% раствором CoCl<sub>2</sub> ( $R_{\text{Spearman}} = 0,87$ ;  $p < 0,05$ ) и умеренно с 0,25% раствором Cr<sub>2</sub>K<sub>2</sub>O<sub>7</sub> ( $R_{\text{Spearman}} = 0,68$ ;  $p < 0,05$ ) через 48 часов с момента постановки АП.

Повышение уровня ТТК в РЖ в ранний период (до 2-х недель) после протезирования является важным маркером развития местного аллергического процесса. Уровень ТТК в РЖ сильно коррелировал с уровнем IgE-антител к Ni-HSA ( $R_{\text{Spearman}} = 0,9$ ;  $p < 0,05$ ) и Cr-HSA – умеренно ( $R_{\text{Spearman}} = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ). В сроки от полугода до 5 лет ТТК в РЖ выявлена только у 3 (16,7%) пациентов с НСМ (n=18), и у них же обнаружены IgE-антитела к металлам в сыворотке крови, что тоже указывает на IgE-зависимый тип реакции. У остальных пациентов этой группы имелся иной тип аллергической реакции – замедленный или гранулоцитопосредованный.

## Литература

1. Voehringer D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013; Vol. 13: 362-375. doi:10.1038/nri3427.
2. StJohn A.L., Abraham S.N. Innate immunity and its regulation by mast cells. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190; no. 9: 4458-4463. doi: 10.4049/jimmunol.1203420.
3. Kumar V., Sharma A. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Mol. Immunol.*, 2010; Vol. 48, no. 1-3: 14-25. doi: 10.1016/j.molimm.2010.07.009.
4. Valent P. Mast cell activation syndromes: definition and classification. *Allergy*, 2013; Vol. 68, no. 4: 417-424. doi: 10.1111/all.12126.
5. Valent P., Akin C., Arock M., Brockow K., Butterfield J.H., Carter M.C., Castells M., Escribano L., Hartmann K., Lieberman P., Nedoszytko B., Orfao A., Schwartz L.B., Sotlar K., Sperr W.R., Triggiani M., Valenta R., Horny H.P., Metcalfe D.D. Definitions, criteria and global classifications of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: a consensus proposal. *Int. Arch. Allergy Clin. Immunol.*, 2012; Vol. 157, no. 3: 215-225. doi: 10.1159/000328760.
6. Ruëff F., Friedl T., Arnold A., Kramer M., Przybilla B. Release of mast cell tryptase into saliva: a tool to diagnose food allergy by a mucosal challenge test? *Int Arch Allergy Immunol.*, 2011; Vol. 155, no. 3: 282-288. doi: 10.1159/000320492.
7. Новиков Д.К., Сергеев Ю.В., Новиков П.Д. Лекарственная аллергия. М.: Нац. акад. микологии, 2001. 313 с.
8. Jogie-Brahim S., Min H.K., Fukuoka Y., Xia H.Z., Schwartz L.B. Expression of alpha-tryptase and beta-tryptase by human

basophils. *J Allergy Clin Immunol.*, 2004; Vol. 113, no. 6: 1086-1092. doi: 10.1016/j.jaci.2004.02.032.

9. Niedoszytko M., Chelmińska M., Chelmiński K., Knopińska-Postuszny W., Gruchała-Niedoszytko M., Jassem E. Late-phase allergic reaction in nasal provocation with fungal allergens. *Allergy Asthma Proc.*, 2008; Vol. 29, no. 1: 35-39. doi: 10.2500/aap2008.29.3078.

10. Vitte J. Human mast cell tryptase in biology and medicine. *Mol Immunol.*, 2015; Vol. 63, no. 1: 18-24. doi: 10.1016/j.molimm.2014.04.001.

11. Chen S., Mu D., Cui M., Ren C., Zhang S., Guo L., Gao W. Dynamic changes and clinical significance of serum tryptase levels in STEMI patients treated with primary PCI. *Biomarkers.*, 2014; Vol. 19, no. 7: 620-624. doi: 10.3109/1354750X.2014.960452.

12. Карпук И.Ю., Фадеев В.И. Выделение ионов металлов из стоматологических сплавов и их влияние на клетки системы иммунитета. *Иммунопатология, аллергология, инфектология* 2017; №3: 6-21.

13. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология: руководство. М.: Мед. лит., 2009, 464 с.

14. Карпук Н.А., Карпук И.Ю. Диагностика аллергии на металлические изделия в реакции алергениндуцированного повреждения лейкоцитов. *Медицинские новости* 2012; №6: 75-76.

15. Новиков П.Д., Новиков Д.К., Титова Н.Д. Диагностика аллергии и гиперчувствительности: ведущее значение клеточных методов. *Иммунопатология, аллергология, инфектология* 2016; №4: 25-39.

## Сведения об авторе:

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.

Поступила 25.08.2017 г.