

## Определение активации базофилов и IgE-антител к компонентам стоматологических материалов при их непереносимости

И.Ю. Карпук, Д.К. Новиков

УО «Витебский государственный медицинский университет»

## Determination of basophil activation and IgE antibodies to the components of dental materials in cases of intolerance to dental prosthetics

I.Y. Karpuk, D.K. Novikov

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

### Аннотация

**Цель работы:** определение активации базофилов крови и IgE-антител на компоненты стоматологических материалов (КСМ) у пациентов с их непереносимостью.

**Методы обследования:** Обследованы 22 пациента с положительными кожными аппликационными пробами (АП) на растворы солей металлов (NiCl<sub>2</sub> (3%), CrCl<sub>3</sub> (3%), CoCl<sub>2</sub> (1%) и жалобами на непереносимость стоматологических материалов (НСМ), и 21 пациент без НСМ. Определяли уровень CD203c+ CD63+ базофилов после инкубации крови с инкубационной жидкостью фрагментов протезов (ЖФП) или раствором солей металлов (РСМ): Ni-Cl<sub>2</sub>, Cr-Cl<sub>3</sub>, Co-Cl<sub>2</sub>, а также наличие IgE-антител к последним методом ИФА.

**Результаты:** После инкубации базофилов с ЖФП и РСМ у пациентов с НСМ и кожной гиперчувствительностью к солям металлов, происходит прирост или снижение количества CD203c+ базофилов. Базофилы пациентов с кожной гиперчувствительностью к КСМ достоверно чаще и сильнее реагировали на ЖФП и соли металлов, чем базофилы пациентов контрольной группы. Установлено, что наибольшей диагностической эффективностью обладает ЖФП (чувствительность – 72,7%; специфичность – 90,5%; AUC 0,86; p=0,0003, при пороге прироста экспрессии CD63+CD203c+ базофилов – 16,68%), чем РСМ в качестве индуктора активации базофилов.

**Вывод:** Тест активации базофилов и определение IgE-антител рекомендуется использовать для выявления гиперчувствительности и аллергии у пациентов с НСМ.

### Ключевые слова

Компоненты стоматологических материалов, базофилы, CD63CD203c, аллергия, проточная цитометрия.

### Summary

**The aim of the study** was to determine blood basophils activation and IgE antibodies to the components of dental materials (CDM) in patients with intolerance to dental prosthetics.

**Materials and methods:** we examined 22 patients with positive skin application tests (AT) with metal salts solutions (NiCl<sub>2</sub> (3%), CrCl<sub>3</sub> (3%), CoCl<sub>2</sub> (1%) and complaints of intolerance to dental materials (IDM), and 21 patients without IDM complaints. We determined the levels of CD203c+CD63+ basophils after incubation of blood with incubation liquid containing particles of prosthetics (LPP) and metal salts solutions (MSS): NiCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, also measured IgE antibodies to these salts using ELISA.

**Results:** in patients with IDM and skin hypersensitivity to metal salts increase or decrease of CD203c+basophils after incubation of basophils with LPP and MSS occurred. In patients with skin hypersensitivity to CDM basophils significantly more often and stronger reacted with LPP and metal salts compared to basophils of control group patients. It was established that LPP had the highest diagnostic efficiency (sensitivity 72,7%; specificity 90,5%; AUC 0,86; p=0,0003; with threshold of expression growth for CD203c+63+ basophils equaling 16,68%), compared to MSS as basophil activation inductor.

**Conclusion:** basophil activation test and IgE antibodies determination are recommended for detection of hypersensitivity and allergy in patients with IDM.

### Keywords

Components of dental materials, basophils, CD63CD203c, allergy, flow cytometry.

## Введение

Известно, что компоненты стоматологических материалов (КСМ) могут вызывать как аллергию, так и реакции гиперчувствительности [1, 2]. Клинически аллергия на КСМ может проявляться зудом и жжением слизистой оболочки полости рта (СОПР), реже – хронической крапивницей на фоне приема лекарств. Механизмы аллергических реакций на КСМ различны, учитывая разнообразие входящих в них веществ, встречаются немедленные и замедленные реакции [3].

При кожной базофильной гиперчувствительности наблюдается опосредованная лимфоцитами замедленная аллергическая реакция с участием значительного количества базофилов [4].

Аппликационные кожные пробы (АП) рассматриваются как золотой стандарт тестирования на предмет аллергии к КСМ [1, 3]. Однако, их результаты не всегда совпадают с реакциями СОПР. Недостатки АП пробуждают интерес к поиску надежных тестов *in vitro* для подтверждения аллергии к КСМ.

Маркер активации базофилов CD63 (гранулоцит-ассоциированный тетраспан), исследовался и сравнивался с АП, в результате чего сообщалось о его меньшей чувствительности и меньшей специфичности для диагностики лекарственной аллергии [5]. Другой маркер активации базофилов – CD203c при лекарственной и пищевой аллергии (экто-нуклеотидная пирофосфатаза/фосфодиэстераза, трансмембранный эктофермент II типа) изучен при разных видах аллергии и оказался достаточно специфичным [6, 7, 8].

При сравнении экспрессии CD203c с CD63 под влиянием аллергенов обнаружено, что CD203c был лучшим маркером, чем CD63, для диагностики аллергии на латекс [7], CD63 более специфичен, а CD203c более чувствителен при аллергии на яд пчел и ос [8]. Третье заключило, что CD63 был более чувствительным, чем CD203c, для диагностики аллергии на миорелаксанты [6], а CD203c более надежный по сравнению с CD63 при диагностике аллергии на кошачью шерсть [9].

Совместимость дентальных сплавов с биологической средой полости рта важна для изготовления безопасных для здоровья пациентов зубных протезов. Достаточно большое количество *in vivo* и *in vitro* исследований указывает на тот факт, что, подвергаясь процессам коррозии и механического износа, дентальные металло-содержащие конструкции выделяют в среду полости рта ионы металлов. Катионы металлов,

соединяясь с белками, приобретают антигенные свойства, провоцируя, как местные, так и общие негативные реакции [1, 2, 3].

Целью данного исследования явилось определение активации базофилов крови и IgE-антител на компоненты стоматологических материалов (КСМ) у пациентов с непереносимостью стоматологических материалов (НСМ).

## Материал и методы исследования

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

Контрольную группу составил 20 пациентов (3 мужчин и 17 женщин) в возрасте от 45 до 68 лет без жалоб на НСМ и без гиперчувствительности к ним, сопоставимые по полу, возрасту, типу конструкций и количеству зубопротезных единиц, согласившиеся пройти обследования на наличие гиперчувствительности к зубопротезным материалам, перед плановой заменой ортопедических конструкций.

Сформированные группы были сопоставимы по возрасту и полу.

Интерпретация результатов кожного тестирования проводилась согласно общепринятой методике [10].

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

Уровень гигиены оценивали по упрощенному индексу гигиены полости рта ОНI-S, а выраженность воспалительного процесса - при помощи индекса GI (оценивали зубы симметричной локализации противоположной стороны челюсти).

*Аппликационное кожное тестирование с растворами солей металлов.*

Всем участникам исследования ставили аппликационные кожные пробы с использованием специальных аппликаторов – FinnChamberonScanpor (Epitest Ltd. Oy, Tulusa, Finland) и тестовых субстанций субстанций - солей металлов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  на вазелиновой основе (Epitest Ltd. Oy, Tulusa, Finland).

В качестве отрицательного контроля использовался чистый медицинский вазелин.

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

Для выявления IgE-антител к ионам металлов мы использовали стандартную иммунофер-

ментную тест-систему фирмы EUROIMMUN (Германия).

В качестве аллергенов были использованы аллергодиски с Ni-HSA, Cr-HSA, Co-HSA, Gold-HSA.

Концентрацию IgE в исследуемых образцах определяли, внося полученные значения оптической плотности в калибровочный график.

*Подготовка КСМ для теста активации базофилов методом проточной цитометрии (ПЦ).*

Жидкость фрагментов протезов (ЖФП), получали путем настаивания образца Co-Cr сплава для изготовления ортопедических конструкций в 10 мл воды специальной очистки в течение 30 дней.

Объем растворителя (10 мл) определяли согласно рекомендациям ISO 10993-5.

Контролем служил растворитель без исследуемых образцов.

Концентрацию ионов металлов в ЖФП определяли методом масс-спектрометрии.

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

Перед использованием в ЖФП добавляли человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) в концентрации 2 г/л, в объеме равном полученной жидкости.

Масса образца для инкубации составила 4,4 грамма; при взвешивании на электронных весах Adventury TМPROAV264.

Наряду с хромом и кобальтом ЖФП содержала другие ионы (табл. 1).

Раствор солей металлов (РСМ) готовили в виде их смеси в равных пропорциях NiCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, готовили в концентрации 0,01 мг/мл в забуференном физиологическом растворе. Человеческий сывороточный альбумин в концентрации 2 г/л добавлялся к этому раствору непосредственно перед использованием.

В качестве негативных контролей использовались образцы нестимулированной цельной крови, инкубированной с ЗФР и ЧСА.

Образцы крови пациентов разделяли в 4 пробирки (12x75 мм), использовали 100 мкл крови на тест: 2 стимулятора и 2 негативных контроля активации.

#### Фенотипирование клеток

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

После добавления к 100 мкл гепаринизированной цельной крови в пробирки по 2,5 мкл ЖФП и РСМ, исследуемые образцы ресуспендировали и культивировали в течение 15 минут при 37°C в термостате. После чего добавляли 2,5 мкл раствора моноклональных антител CD203c-PE и CD63-FITC, перемешивали на вортексе и инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем добавляли раствор, лизирующий эритроциты, и инкубировали при температуре 37°C еще 10 мин, добавляли 500 мкл буферного раствора и фенотипировали.

Исследование проводили на проточном цитометре CytomicsFC 500 (BeckmanCoulterInc., США) с использованием моноклональных антител CD203c-PE и CD63-FITC. Использовали моноклональные антитела производства «Invitrogen Corporation», «Life Technologies Corporation», «Beckman Coulter», США.

#### Статистический анализ

Результаты ПЦ-анализа анализировались вслепую, лаборант-оператор не знал о диагнозах пациентов. Наоборот, диагностика аллергии

**Таблица 1. Концентрации ионов (мг/л) в воде через 30 дней после инкубации образца сплава для изготовления ортопедических конструкций**

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

проводилась, прежде чем результаты ПЦ становились известны.

Расчеты показателей проводились в программе Statistica 10.0. Данные, подчиняющиеся закону нормального распределения (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ ), обрабатывались с помощью критерия T-test, непараметрические данные – с помощью критериев Mann-Whitney UTest (M-U), парного теста Wilcoxon Matched Pairs Test с указанием уровня достоверности расчета (p). Корреляция показателей оценивалась с помощью непараметрического теста Spearman Rank Order Correlations с указанием степени и уровня достоверности расчета (p). Для оценки значимости критериев применялся ROC-анализ с указанием чувствительности, специфичности, уровня значимости (AUC), достоверности (p). ROC-анализ проводили в программе MedCalc.

О качестве метода диагностики судили по экспертной шкале, которая базируется на величине AUC и имеет несколько градаций: площадь AUC, равная 0,9-1 – отличное качество модели, 0,8-0,9 – очень хорошее, 0,7-0,8 – хорошее, 0,6-0,7 – среднее, 0,5-0,6 – неудовлетворительное.

## Результаты исследования

### Аппликационные пробы

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

У 6 (27,3%) пациентов АП были резко положительными, у 4 (18,2%) – сильноположительными и у 5 (22,7%) пациентов положительными к раствору соли  $\text{NiCl}_2$  (3%).

К раствору соли  $\text{CrCl}_3$  (3%) по результатам проведения АП у 5 (22,7%) пациентов были отмечены резкоположительные реакции, у 3 (13,63%) пациентов – сильноположительные и у 3 (13,63%) пациентов положительные реакции.

Кожная гиперчувствительность к раствору соли  $\text{CoCl}_2$  (1%) 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.

При этом результаты проведения АП были одновременно положительными на  $\text{NiCl}_2$  (3%) и  $\text{CrCl}_3$  (3%) – у 7 (31,8%) пациентов, на  $\text{NiCl}_2$  (3%) и  $\text{CoCl}_2$  (1%) – у 5 (22,7%) пациентов; на  $\text{CrCl}_3$  (3%) и  $\text{CoCl}_2$  (1%) – у 2 (9%) пациентов, а на  $\text{NiCl}_2$  (3%),  $\text{CrCl}_3$  (3%) и  $\text{CoCl}_2$  (1%) – у 2 (9%) пациентов.

### Тест активации базофилов у пациентов с НСМ

У пациентов с НСМ показано увеличение количества  $\text{CD63}+\text{CD203c}+$  базофилов с использованием в качестве индуктора их активации РСМ и ЖФП.

Процент аллерген-активированных базофилов определяли как процент базофилов, экспрессирующих маркер, минус его значение в нестимулированной контрольной пробе.

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

По результатам тестов рассчитывали оптимальный порог процента прироста  $\text{CD63}+\text{CD203c}+$  базофилов при оптимальных значениях чувствительности (Se) и специфичности (Sp) для различных индукторов их активации.

Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности наблюдалось для ЖФП-А, где AUC был равен 0,86. Этот параметр указывает на высокую диагностическую значимость этого лабораторного теста (рис.1).

При выборе из нескольких лабораторных тестов, обладающих сопоставимой диагностической мощностью, проводится их сравнение по другим дополнительным критериям. К ним относится соотношение «стоимость-эффективность» теста, а также неинвазивность, простота анализа и представления результатов, быстрота выполнения.

С учетом того, что получение ЖФП длительный процесс, требующий использования специального оборудования для оценки концентрации ионов металлов в растворе, РСМ является наиболее подходящим индуктором экспрессии  $\text{CD63}+\text{CD203c}+$  на базофилах, сопоставимым по специфичности с ЖФП (рис. 1, 2) (табл.2).

Медиана значений процента базофилов, экспрессирующих маркеры активации  $\text{CD63}+\text{CD203c}+$  с ЖФП, были выше тех, что наблюдались при использовании РСМ в качестве индуктора (табл.3). Процент базофилов с РСМ был выше, чем с контрольными растворами – ЧСА, ЗФР (табл. 2). 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.

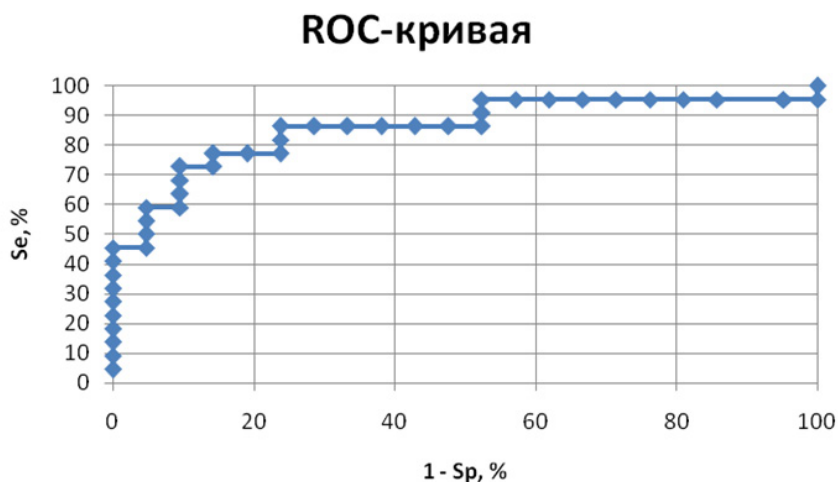


Рис. 1. ROC-анализ для определения аллергии на КСМ с ЖФП, в качестве индуктора активации CD63+CD203c+

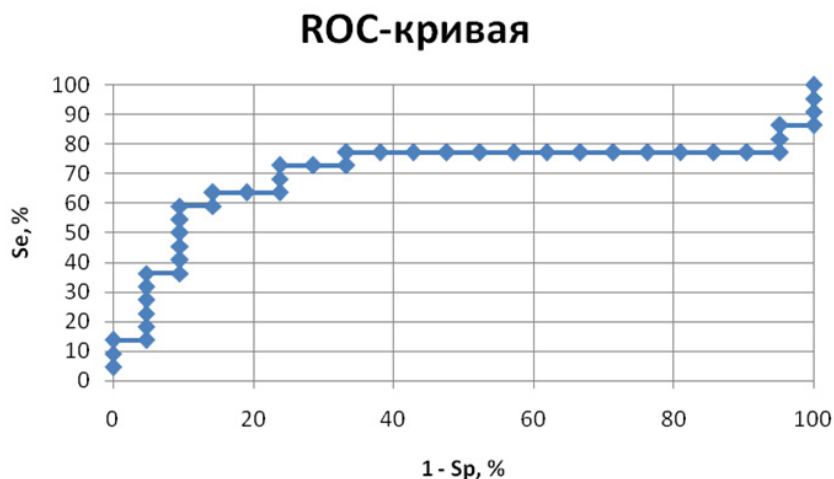


Рис. 2. ROC-анализ для определения аллергии на КСМ с РСМ, в качестве индуктора активации CD63+CD203c+ базофилов

Таблица 2. Сравнение различных индукторов активации CD63+CD203c+базофилов в диагностике аллергии на КСМу пациентов

Индукторы	Se	Sp	AUC	p	Оптимальный порог прироста
ЖФП	72,7%	90,5%	0,86	0,0003	16,68%
РСМ	64,1%	90%	0,7	0,04	17,2%

Следует отметить, что у 17 пациентов опытной группы отмечался прирост количества базофилов с маркерами активации под влиянием ЖФП, а у 5-ти, у которых их количество было исходно повышенным, наблюдалось его снижение.

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

ми антителами в результате чего активируются базофилы [11, 12]. Увеличение количества CD63+CD203c+ базофилов у пациентов с HCM является важным диагностическим признаком у лиц с аллергией на КСМ.

#### Анализ корреляции результатов

Результаты, полученные при использовании ЖФП в качестве индуктора активации CD63+CD203c+, сильно умеренно коррелировали с результатами АП с 3% раствором соли NiCl<sub>2</sub> 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 раствором соли NiCl<sub>2</sub> через 48 часов с момента постановки АП ( $R_{\text{Spearman}}=0,56; p < 0,05$ ) (табл. 4).

При постановке теста активации CD63+CD203c+ базофилов с ЖФП установлено наличие умеренной корреляции с результатами АП с 3% раствором соли CrCl<sub>3</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 3% раствором соли CrCl<sub>3</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+сЖФП, выявил наличие корреляции с результатами АП с 1% раствором соли CoCl<sub>2</sub> 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 1% раствором соли CoCl<sub>2</sub> через 48 часов с момента постановки АП ( $R_{\text{Spearman}}=0,62; p < 0,05$ ).

#### Определение IgE-антител к солям металлов

IgE-антитела к Ni-HSA, в группе пациентов с HCM выявлены у 16 (72,7%) пациентов в ИФА. При обследовании сывороток крови пациентов контрольной группы IgE-антитела к Ni-HSA были выявлены у 2 (10%) пациентов (табл. 5).

IgE-антитела к Cr-HSA в группе пациентов с кожной гиперчувствительностью обнаружены у 14 (63,6%) пациентов. У пациентов контрольной группы обнаружены IgE-антитела к Cr-HSA методом ИФА у 1 (5%) пациента.

Методом ИФА IgE-антитела к Co-HSA в группе пациентов с HCM выявлены у 11 (50%) пациентов в ИФА, а в контрольной группе пациентов IgE-антитела к Co-HSA выявлены не были.

Как видно из приведенных данных (таблица 5), IgE-антитела к металлам-ЧСА в сыворотке

**Таблица 3. Количество (процент) базофилов, экспрессирующих маркеры активации CD63+CD203c+**

Группы	ЖФП	PCM	ЧСА	Физ. раствор
Опытная группа (n=22)	47,33	43,35	29,55	22,54
-увеличение (17)	[29,33; 56,0]*, +	[35,79; 49,86]*, +	[19,81; 36,48]	[14,93; 30,02]
-снижение (5)				
Контрольная группа (n=20)	14,43	15,51	17,71	14,81
	[10,9; 19,05]	[11,2; 20,51]	[14,0; 22,57]	[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 ЖФП, 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 NiCl <sub>2</sub>	АП с NiCl <sub>2</sub>	АП с CrCl <sub>3</sub>	АП с CrCl <sub>3</sub>	АП с CoCl <sub>2</sub>	АП с CoCl <sub>2</sub>
ЖФП	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. \* –  $p < 0,05$ .

**Таблица 5. Частота наличия IgE-антител к солям металлов у пациентов**

Группы пациентов	Ni-HSA n(%)	Cr-HSA n(%)	Co-HSA n(%)
С гиперчувствительностью (n=22)	16(72,7%)*	14(63,6%)*	11 (50%)*
Контрольная группа(n=20)	2(10%)	1(5%)	0

Примечание. \* – отличие между опытной по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

крови пациентов с HCM встречались чаще, чем у пациентов контрольной группы.

Результаты выявления IgE-антител у пациентов с HCM, указывает на IgE-зависимую клиническую форму повышенной чувствительности к комплексу металл-белок.

Обнаружение IgE-антител не доказывает, что именно этот аллерген ответственен за клиническую симптоматику; окончательное заключение и интерпретация лабораторных данных должны быть сделаны только после сопоставления с клинической картиной и данными выявления сенсибилизации к металлам.

Анализ корреляции у пациентов с HCM уровня экспрессии CD63+CD203с+базофилов под воздействием ЖФП-А с уровнем IgE-антител: сильная с Ni-HSA ( $R_{\text{Spearman}} = 0,82$ ;  $p < 0,05$ ) и Co-HSA ( $R_{\text{Spearman}} = 0,87$ ;  $p < 0,05$ ); а с Cr-HSA – умеренная ( $R_{\text{Spearman}} = 0,41$ ;  $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

Результаты диагностики гиперчувствительности и аллергии на КСМ по приросту уровня CD63+CD203с+ базофилов, с использованными нами индукторами экспрессии, отличаются. У пациентов с кожной гиперчувствительностью к КСМ, ЖФП показала большую чувствительность, чем РСМ, для обнаружения металл-активированных базофилов. У пациентов с КСМ-индуцированной HCM, под воздействием обоих вариантов индукторов результаты ПЦ-анализа отличались от контроля ( $p < 0,05$ ). Однако ЖФП в качестве индуктора активации CD63+CD203с+базофилов была более активной и специфичной и результаты с ней наиболее сильно коррелировали с результатами АПи уровнями IgE-антител.

Нами замечено, что чувствительность ПЦ 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 [11]. Однако все пациен-

ты, которых мы отобрали в исследование, имели положительные результаты АП, таким образом, пациенты с потерей чувствительности по АП не изучались. Точно не известно, есть ли различия относительно кинетики потери чувствительности к КСМ, проявляющиеся в АП и в экспрессии маркеров активации базофилов.

У большинства пациентов с HCM обнаружена аллергия на соли металлов в РАПЛ [13] и трансбуккальном тесте [14]. Полученные нами результаты при использовании в качестве аллергена ЖФП показали, что чувствительность ПЦ была более высокой и имела статистическую значимость, чем с РСМ. Это предполагает, что активация базофилов зависит от природы индуктора их активации *in vitro*. У пациентов без жалоб на HCM и с отрицательными АП наши индукторы не являются активаторами базофилов с экспрессией CD203с, что позволяет предположить наличие специфического пути активации для этих «модельных аллергенов» у пациентов с HCM. В сущности, базофилы или тучные клетки могут быть активированы различными механизмами связывания IgE-антител или через клеточные рецепторы [7, 15]. Поэтому тест активации базофилов отражает как IgE-зависимую, так и неспецифическую гиперчувствительность [15].

На сегодняшний день нет единого мнения насчет того, что использовать в качестве индуктора для диагностики гиперчувствительности к КСМ *in vitro*. Соли металлов [1, 2] в настоящий момент наиболее часто используемый аллерген. Однако, по мнению некоторых авторов [1] для наиболее достоверной диагностики гиперчувствительности необходимо использовать компоненты причинных стоматологических материалов, которые получают путем их измельчения твердосплавной фрезой и настаивания в течение двух суток [16]. Однако абразивные материалы, используемые при их измельчении, также попадают в получаемый порошок, и в последующем оказывают сильное цитотоксическое действие на лейкоциты. Поэтому мы настаивали не стружку, а зубопротезные сплавы, не подвергшиеся воздействию.

Кроме того, известно, что сами по себе ионы металлов не являются полноценными аллергенами, а приобретают антигенные свойства при связывании с белками ротовой жидкости и плазмы крови, поэтому мы добавляли к ним ЧСА [13].

Различие в степени чувствительности активации CD63CD203ск ЖФПи РСМ, как индукторов, может иметь различные объяснения. Это может быть связано выбранный нами длительностью инкубации с данными активаторами, возможно не самой оптимальной для экспрессии CD63+CD203с+. Возможно для РСМ более подходящим было бы большее время инкубации с кровью пациента. С другой стороны, ЖФП содержит все компоненты, выделяющиеся из сплавов в раствор, и несмотря на их низкую концентрацию, соединяясь с ЧСА они создают аллерген-индуктор, вызывающий экспрессию CD63+CD203с+ на базофилах, а РСМ, формируют аллерген иной специфичности чем ЖФП.

Положительные результаты теста активации базофилов, у АП-отрицательных пациентов, могут быть как с использованием РСМ, так и ЖФП и могут быть обусловлены неспецифической гиперчувствительностью.

Хотя АП остаются золотым стандартом для диагностики аллергии на КСМ [3], ложноположительные АП безусловно имеют место, так как в большинство панелей для определения аллергии к металлам входят растворы солей металлов 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 их в клинических целях [1].

Однако остается неясной достоверность результатов такой диагностики при сравне-

нии АП с тестом активации базофилов, что подчеркивает его диагностическое значение, как способа исключения или подтверждения аллергии на КСМ для пациентов, нуждающихся в протезировании.

## Выводы

1. После инкубации лейкоцитов крови, пациентов с НСМ и кожной гиперчувствительностью к солям металлов с ЖФП и РСМ, происходит увеличение или снижение количества CD63+CD203с+ базофилов.
2. Наивысшей диагностической эффективностью обладает ЖФП, (чувствительность – 72,7%; специфичность – 90,5%; AUC 0,86;  $p=0,0003$ ), чем РСМ.
3. Данные, полученные при использовании ЖФП в качестве индуктора активации CD63+CD203с+, сильно коррелировали с результатами АП с 3% раствором  $NiCl_2$  ( $R_{\text{Spearman}}=0,79$ ;  $p < 0,05$ ) и с 1% раствором  $CoCl_2$  ( $R_{\text{Spearman}}=0,87$ ;  $p < 0,05$ ) и умеренно с 3% раствором  $CrCl_3$  ( $R_{\text{Spearman}}=0,68$ ;  $p < 0,05$ ) через 48 часов с момента постановки АП. При стимуляции базофилов РСМ отмечена умеренная корреляция теста с результатами АП с растворами солей:  $NiCl_2$  ( $R_{\text{Spearman}}=0,56$ ;  $p < 0,05$ ),  $CrCl_3$  ( $R_{\text{Spearman}}=0,54$ ;  $p < 0,05$ ) и  $CoCl_2$  ( $R_{\text{Spearman}}=0,62$ ;  $p < 0,05$ ).
4. У пациентов с кожной гиперчувствительностью к металлам ( $n=22$ ) выявлены IgE-антитела к: Ni-HSA – у 72,7% пациентов, Cr-HSA – у 63,6% пациентов, Co-HSA – у 50% пациентов. У пациентов с НСМ повышение уровня экспрессии CD63+CD203с+ базофилов под воздействием ЖФП 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 ( $R_{\text{Spearman}}=0,41$ ;  $p < 0,05$ ).
5. Тест активации базофилов и определение IgE-антител рекомендуется использовать для выявления гиперчувствительности и аллергии у пациентов с НСМ.

## Литература

1. Лебедев К.А., Митронин А.В., Понякина И.Д. Непереносимость зубопротезных материалов. М.: ЛИБРОКОМ, 2010, 208 с.
2. Наумович С.А., Титов П.Л. Характеристика гуморальных факторов иммунитета у пациентов с жалобами на неблагоприятное действие дентальных сплавов. *Соврем. стоматология* 2005; №1: 48–51.

3. Biocompatibility of Dental Materials Schmalz Gottfried 2008 Springer P. 379.
4. Otsuka A., Nonomura Y., Kabashima K. Roles of basophils and mast cells in cutaneous inflammation. *Semin Immunopathol.* 2016 Sep.; Vol. 38, N 5: 563–570. doi: 10.1007/s00281-016-0570-4.



5. Torres M.J. et al. The diagnostic interpretation of basophil activation test in immediate allergic reactions to betalactams. *ClinExp Allergy* 2004; Vol. 34, N 11: 1768–75.
6. Sudheer P.S. et al. Flow cytometric investigation of peri-anesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c. *Anaesthesia*. 2005; Vol. 60, N 3: 251–256.
7. Boumiza R. et al. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD 63. *ClinExp Allergy*. 2003; Vol. 33, N 2: 259–265.
8. BÜhring H.J., Streble A., Valent P. The basophil-specific ectoenzyme E-NNP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004; Vol. 133: 317–329.
9. Ocmant A. et al. Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J Immunol Methods*. 2007; Vol. 30: 40–48.
10. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. М.-Витебск, 1996, 282 с.
11. Gilfillan A.M., Beaven M.A. Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol*. 2011; Vol. 31, N 6: 475–529.
12. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Карпук И.Ю. и др. Новые методы диагностики и иммунотерапии аллергии. *Аллергология и иммунология* 2015; Т. 16, №4: 335–340.
13. Карпук Н.А., Карпук И.Ю. Диагностика аллергии на металлические изделия в реакции аллергениндуцированного повреждения лейкоцитов. *Мед. новости* 2012; №6: 75–76.
14. Новиков Д.К. и др. Трансбуккальный способ диагностики аллергии по увеличению пероксидазной активности в слюне. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2015; №4: 35–43.
15. Новиков П.Д., Новиков Д.К., Титова Н.Д. Диагностика аллергии и гиперчувствительности: ведущее значение клеточных методов. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2016; №4: 25–39.
16. Дубова Л.В., Воложин А.И., Бабахин А.А. Биосовместимость стоматологических материалов – оценка безопасности по способности к гистаминолиберации. *Стоматология* 2006; Т. 85, №4: 4–8.

#### Сведения об авторах:

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

Контакты: 210029, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. Правды, д. 66, кв. 112., тел. раб.: +375 212 22-53-80, тел. моб.: +375 29 711-97-36, e-mail: ikarpuk@mail.ru, Карпук Иван Юрьевич.

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

Поступила 21.03.2017 г.