



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.6.1.008>
УДК 616.314–7:577.322.5



Карпук И.Ю.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь

Влияние компонентов стоматологических материалов на метаболическую и функциональную активность нейтрофилов *in vitro*

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 15.11.2021
Принята: 28.02.2022
Контакты: ikarpuk@mail.ru

Резюме

Введение. Механизмы влияния компонентов медицинских сплавов на организм человека изучаются многими учеными в СНГ и за рубежом, данные об их воздействии на систему иммунитета представлены фрагментарно, а иногда недостаточно научно, что обуславливает отсутствие научно обоснованных лабораторно-клинических критериев постановки диагноза и установления причинности, как индуктора патологического состояния.

Цель. Изучение влияния растворов ионов металлов из стоматологических сплавов и растворов их солей на функциональную и метаболическую активность лейкоцитов крови.

Материалы и методы. Обследовано 22 пациента с жалобами на НСМ. Контрольную группу составили 19 пациентов без жалоб на НСМ.

Результаты и обсуждение. После инкубации фрагментов стоматологических сплавов в воде наблюдается выделение ионов металлов, зависимое от времени инкубации. Этот РКМ изменял метаболическую и киллинговую активность нейтрофилов крови пациентов с НСМ, что может быть маркером непереносимости протезных материалов.

Установлена определенная схожесть индукции выброса цитокинов под влиянием РКМ и РСМ, что позволяет научно обосновать использование РСМ для диагностики гиперчувствительности к дентальным сплавам, так как получение и стандартизация РКМ – длительный и трудоемкий процесс.

Заключение. Изменение метаболической и киллинговой активности нейтрофилов крови пациентов под влиянием компонентов дентальных сплавов может служить маркером их биосовместимости и критерием реакций гиперчувствительности.

Ключевые слова: нейтрофилы, непереносимость стоматологических материалов

Karpuk I.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship of Medical University, Vitebsk, Belarus

Effect of Components of Dental Materials on the Metabolic and Functional Activity of Neutrophils in vitro

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 15.11.2021

Accepted: 28.02.2022

Contacts: ikarpuk@mail.ru

Abstract

Introduction. The mechanisms of influence of the components of medical alloys on the human body are studied by many scientists in the CIS and abroad, data on their effect on the immune system are presented fragmentarily, and sometimes not scientifically enough, which causes the lack of scientifically based laboratory and clinical criteria for diagnosing and establishing causality as an inducer of a pathological condition.

Purpose. Study of the influence of solutions of metal ions from dental alloys and solutions of their salts on the functional and metabolic activity of blood leukocytes.

Materials and methods. 22 patients with complaints of NSM were examined. The control group consisted of 19 patients without complaints about NSM.

Results and discussion. After incubation of fragments of dental alloys in the water, there is a release of metal ions, depending on the incubation time. This RCM changed the metabolic and killing activity of neutrophils of the blood of patients with NSM, which may be a marker of intolerance to prosthetic materials.

A certain similarity of induction of cytokine emission under the influence of RCM and RSM has been established, which makes it possible to scientifically substantiate the use of PCM for the diagnosis of hypersensitivity to dental alloys, since the production and standardization of RCM is a long and time-consuming process.

Conclusion. A change in the metabolic and killing activity of neutrophils in the blood of patients under the influence of components of dental alloys can serve as a marker of their biocompatibility and a criterion for hypersensitivity reactions.

Keywords: neutrophils, intolerance to dental materials

■ ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на тот факт, что механизмы влияния компонентов медицинских сплавов на организм человека изучаются многими учеными в СНГ и за рубежом, данные об их воздействии на систему иммунитета представлены фрагментарно, а иногда недостаточно научно, что обуславливает отсутствие научно обоснованных лабораторно-клинических критериев постановки диагноза и установления причинности, как индуктора патологического состояния [1, 2].

Влияние стоматологических сплавов (СС) на систему врожденного иммунитета остается неясным. Поэтому существует необходимость в проведении исследований



по изучению влияния компонентов стоматологических материалов (КСМ) на различные звенья СИ.

Изучение *in vitro* реакций клеток цельной крови пациентов под воздействием компонентов стоматологических материалов показало влияние на активацию лимфоцитов и базофилов, а также на изменение концентрации в крови ряда цитокинов [3–8]. Подобные изменения под влиянием солей металлов были зарегистрированы и другими авторами [2–4]. Указанные изменения содержания цитокинов в сыворотке крови сопровождаются увеличением спонтанной продукции лейкоцитами медиаторов воспаления интерферона γ и ИЛ-1 β [5, 11]. Подобный дисбаланс сывороточного цитокинового профиля с одновременной экспрессией медиаторов Т-хелперов типа 1 и 2, участвующих в развитии воспаления и аллергических реакций, может отражаться на изменении реактивности в первую очередь эффекторов врожденного иммунитета [12]. Нейтрофилы обладают всеми функциями фагоцитирующих клеток: адгезивностью, подвижностью, способностью к хемотаксису, свойством захватывать бактерии и другие частицы, убивать захваченные организмы с помощью кислород-зависимых или кислороднезависимых механизмов и элиминировать захваченные объекты фагоцитоза [13, 14]. Вместе с тем чрезмерная активация клеток врожденного иммунитета запускает каскадную гиперпродукцию медиаторов воспаления, что ведет к эскалации патологических нарушений в организме пациента. В связи с этим оценка функциональной активности нейтрофилов может являться фактором прогноза развития воспалительных осложнений слизистой оболочки рта (СОР) на фоне непереносимости стоматологических материалов (НСМ). Кроме того, результаты исследования могут способствовать расширению представлений о роли нейтрофилов в патогенезе аллергии на КСМ.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния растворов ионов металлов из стоматологических сплавов и растворов их солей на функциональную и метаболическую активность лейкоцитов крови.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 22 пациента в возрасте от 41 до 72 лет, из них 3 мужчин и 19 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 составили 19 пациентов (2 мужчин и 17 женщин) в возрасте от 43 до 69 лет без жалоб на НСМ и без гиперчувствительности к ним, сопоставимых по типу ортопедических конструкций и количеству зубопротезных единиц, добровольно согласившихся пройти обследование на наличие гиперчувствительности к зубопротезным материалам перед плановой заменой ортопедических конструкций. Сформированные группы были сопоставимы по возрасту и полу. Все пациенты, включенные в исследование, дали и собственноручно заполнили информированное согласие на участие в работе.

Для исследования были использованы коммерчески доступные и зарегистрированные в Республике Беларусь СС (табл. 1).

Таблица 1
Характеристика и последовательность получения образцов СС
Table 1
Characteristics and sequence of obtaining SS samples

Номер образца	Название образца	Способ изготовления
1	Сплав Co-Cr	Отрезали 3 см от восковой проволоки (Dentaurum, Германия) диаметром 5 мм и производили замену на сплав для металлокерамики и бюгелей кобальтохромовый (Gialloy PA, BK Giulini GmbH, Германия, ИМ-7.7257/1108) на центробежной индукционной литейной установке Ducatron Quattro (Ugin, Франция). Очистку от паковочной массы осуществляли при помощи пескоструйной обработки 200 мкм Al_2O_3 . Далее проводили ультразвуковую очистку, шлифовку, полировку образца и пароструйную обработку
2	Сплав Co-Cr с TiN-напылением	Образец 1 напыляли TiN
3	Штампованно-паяный без TiN-напыления	Исходную длину гильзы из стальной нержавеющей ленты, изготовленной методом штамповки и применяемой в зубопротезировании для производства зубных коронок диаметром 8 мм (ООО «Полимер-Стоматология», Белгород, Россия) (далее – гильза), при помощи ножниц обрезали до 1 см, края сглаживали твердосплавной фрезой, обрабатывали пароструйным аппаратом. Обработанные гильзы припаивали основанием (жевательной поверхностью) к обоим концам образца 1. Концы гильзы приближали друг к другу до плотного соприкосновения. После чего проводили шлифовку, полировку образца и пароструйную обработку
4	Штампованно-паяный с TiN-напылением	Образец 3 напыляли TiN

Для обеспечения однородности образца диаметр ($R=5\pm0,1$ мм) и высоту ($h=3\pm0,1$ мм) каждого проверяли с помощью штангенциркуля и линейки. Массу образцов определяли при взвешивании на электронных весах Adventury TMPROA V264 (0,01–260 г). Для образцов 1 и 2 масса составила $4,4\pm0,050$ г, для образцов 3 и 4 – $5,6\pm0,050$ г. Для исследования использовалась вода 1-го класса (ультрачистая с удельным сопротивлением 18,18 МОм·см при 25 °C) (далее – вода).

Каждый из образцов погружали в промаркированные полипропиленовые пробирки, содержащие 10 мл воды, и инкубировали 60 дней. Все пробы инкубировали при 37 °C и ежедневно по 1 ч гомогенизировали с использованием шейкера (Vortex NM-110). Измерения pH не проводились, чтобы избежать нарушения процесса выделения ионов. Из каждой пробирки забирали по 2 мл погружного раствора, перемешивали с 2 мл азотной кислоты, определяли уровни ионов Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Zn после 2, 7, 14, 21 и 30 дней погружения и анализировали методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Varian 720 в режиме аксиального обзора плазмы, США). После каждого забора доливали 2 мл воды в каждую из пробирок и учитывали это при расчетах. Для контроля выделения ионов металлов в полипропиленовых пробирках были также подготовлены контрольные пробирки, содержащие только воду.

Существует тесная связь между условиями проведения экспериментов и возможными экспериментальными результатами. По этой причине особое внимание уделялось контролю состава воды.



Атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Varian 720 предназначен для одновременного прецизионного экспресс-определения до 73 элементов периодической таблицы в жидких пробах. Он обеспечивает одновременное измерение практически всех эмиссионных линий элементов, позволяя определять все компоненты пробы после однократной аспирации. Типичный диапазон определяемых концентраций – от десятых долей ppb ($10^{-8}\%$) до десятков процентов. Линейный диапазон одиночного определения (в режиме MultiCal) – до 6 порядков. Использовался метод внешнего стандарта. Градуировочные растворы готовили из мультиэлементного стандартного раствора ICP multi-element standard solution IV Merk 111355 в диапазоне от 0,0005 до 5,0 мг/л. Анализ каждого образца проводили в 3 повторях, и значение получали путем вычисления среднего значения из 3 экспериментов. Для того чтобы полученные образцы были пригодны для постановки НСТ-теста, к ним добавляли 1,8 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР), получая 0,9% раствор.

Исследовали влияние на лейкоциты 0,001% растворов солей металлов в отдельности, кроме этого, готовили раствор солей металлов (PCM) в виде их смеси в равных пропорциях NiCl_2 , CrCl_3 , CoCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , MnCl_2 в концентрации 0,01 мг/мл в ЗФР. Применение смеси солей металлов обусловлено составом СС.

Определение метаболической активности нейтрофилов в реакции восстановления нитротетразолиевого синего

Определение метаболической функции нейтрофилов проводили в реакции восстановления нитротетразолиевого синего (НСТ-тест). Утром натошак брали 5–10 мл крови из вены в пробирку с гепарином (20 ЕД на 1 мл крови). Кровь отстаивали в пробирке в течение 1 ч до момента четкого отделения эритроцитов от лейкоцитов. Отсасывали взвесь лейкоцитов с аутологичной плазмой, центрифугировали при 1000 об/мин, плазму отсасывали, осадок лейкоцитов разводили физиологическим раствором хлорида натрия с добавлением 20% аутологичной плазмы до $5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Добавление аутоплазмы увеличивало жизнеспособность лейкоцитов [14]. Поглонительную активность лейкоцитов крови оценивали в реакции фагоцитоза убитой нагреванием микробной взвеси *Staphylococcus aureus* стандартного штамма 209. Метаболическую активность оценивали в спонтанном НСТ-тесте, а также индуцированном *Staphylococcus aureus* с применением 0,1% раствора НСТ. НСТ, сталкиваясь с активированным нейтрофилом, восстанавливается в диформаза, который в виде гранул откладывается внутри или на поверхности клеток. В исследуемые пробы добавляли по 100 мкл исследуемых растворов (настойки образцов и растворы солей металлов). Контрольные пробы ставились с ЗФР. Опытные и контрольные пробы инкубировали в термостате 30 мин при температуре 37 °С. Центрифугировали 3 мин при 1000 об с последующим удалением надосадочной жидкости и ресуспендированием в 100 мкл физиологического раствора. Мазки после высыхания на воздухе фиксировали 96% раствором этанола и окрашивали 0,1% раствором нейтрального красного. Микроскопия проводилась под иммерсионным увеличением ($1,25 \times 100$) с учетом количества формазанположительных гранулоцитов в НСТ-тесте и количества гранулоцитов, поглотивших 1 и более тест-частицу (стафилококк) при оценке фагоцитоза с подсчетом не менее 100 гранулоцитов.

Определение фагоцитарной активности лейкоцитов

Кровь готовили как и для НСТ-теста. Клетки *Candida albicans* культивировали в течение 24 ч на скошенном агаре с глюкозой. Перед работой клетки смывали физиологическим раствором хлорида натрия, дважды отмывали и готовили суспензию с концентрацией *Candida albicans* $5 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл. Количество нежизнеспособных *Candida albicans* в тесте с метиленовым синим не превышало 5%.

Постановка реакции киллинга: в ряд пробирок вносили 100 мкл суспензии лейкоцитов пациента и добавляли 50 мкл рабочей взвеси кандид и 50 мкл раствора образца СС и солей металлов. В контроль компоненты стоматологических материалов не добавлялись. Пробы инкубировали в термостате 1 ч при 37 °С. Затем взвесь клеток центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин, отсасывали надосадочную жидкость.

К осадку клеток, оставшихся в пробирке, добавляли 200 мкл дистиллированной воды для лизиса клеток крови и ресуспендировали. Для окрашивания убитых фагоцитами кандид добавляли на 10 мин 500 мкл смеси равных объемов 0,2% водного эозина и 0,1% метиленового синего на дистиллированной воде. Далее взвесь клеток центрифугировали, надосадочную жидкость отсасывали, а из осадка делали мазок, высушивали и подсчитывали при световой микроскопии процентное содержание убитых фагоцитами окрашенных в темно-синий цвет дрожжевых клеток. Живые кандиды имели легкую розоватую окраску. Степень модификации киллинга (стимуляция – угнетение) учитывали при изменении показателя на 20% и более по сравнению с контрольными значениями.

В контрольных исследованиях с лейкоцитами доноров погибало $25,0 \pm 3,8\%$ кандид, что соответствует данным других авторов.

Статистический анализ

Расчеты 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).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов с НСМ отмечено увеличение метаболической активности нейтрофилов в индуцированном стафилококком НСТ-тесте (44 [31; 53]) по сравнению со спонтанным (16 [12; 19]) с ЗФР.

Нами установлено, что все образцы в различной степени влияли на метаболическую активность нейтрофилов крови пациентов с НСМ, а образцы 2–4 через 21 день настаивания влияли на метаболическую активность нейтрофилов сопоставимо с культурой убитого стафилококка ($p \leq 0,05$) (табл. 2, рис. 1).

Обращает на себя внимание факт резкого снижения влияния образцов на метаболическую активность нейтрофилов при добавлении 100 мкл человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в концентрации 2 г/л к 100 мкл настоек исследуемых образцов (табл. 2, рис. 1). Этот факт можно объяснить связыванием ионов металлов ЧСА: комплексообразованием тетрапиррольных соединений [17].

Установлено, что наиболее сильно влиял на нейтрофилы образец 3, а наименее – образец 1. Это, по-видимому, связано с более выраженным качественным и количественным высвобождением ионов из образца 3.



Таблица 2
Метаболическая активность нейтрофилов крови пациентов с HCM (n=22) в НСТ-тесте под влиянием образцов СС
Table 2
Metabolic activity of neutrophils of blood of patients with NSM (n= 22) in the NST test under the influence of SS samples

Время инкубации образцов	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
2 дня	21,64 [12; 32]	18,57 [11; 29]	20,32 [13; 34]	29 [24; 36]
7 дней	22 [19; 29]	26,71 [12; 37]	25,3 [16; 34]	34,5 [19; 44]
14 дней	19,3 [7; 32]	27,4 [15; 38]	31,7 [22; 42]	27,9 [21; 34]
21 день	22,8 [12; 32]	30,8 [22; 39]	36 [29; 48]	32 [14; 40]
30 дней	27 [23; 30]	31,5 [22; 46]	38 [31; 55]	35 [20; 44]
30 дней+ЧСА	11 [7; 19]	9 [6; 14]	14 [9; 18]	10,3 [5; 16]

Анализ полученных данных позволил выявить прямую сильную корреляцию между сроками пользования причинным типом ортопедических конструкций и результатами НСТ-теста с образцами 3 ($R=0,75$; $p\leq 0,05$) и 4 ($R=0,77$; $p\leq 0,05$) (рис. 1).

Влияние испытуемых образцов на метаболическую активность нейтрофилов пациентов контрольной группы изучали с образцами после 30 дней инкубации.

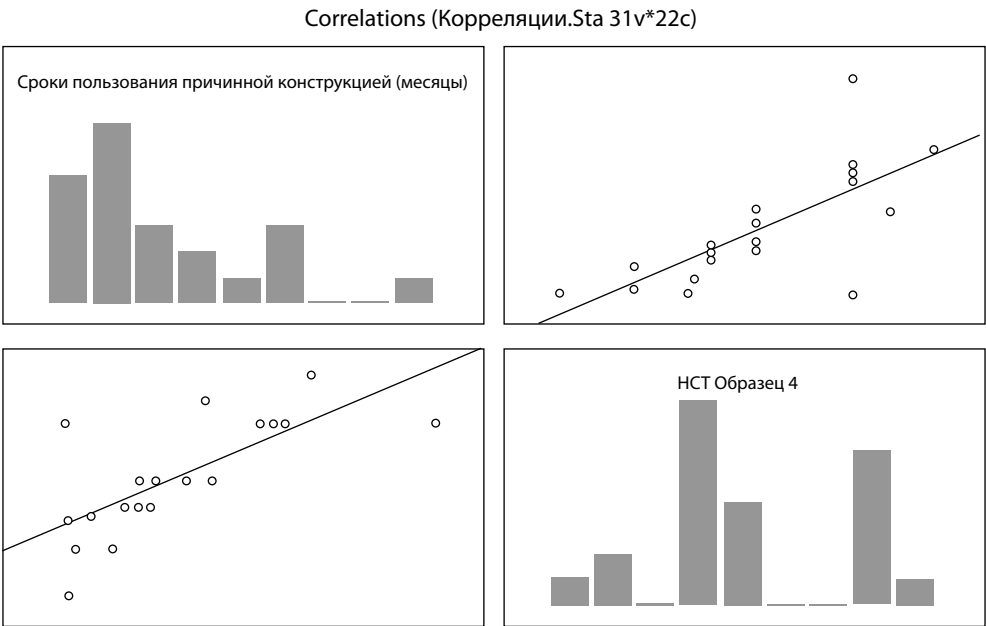


Рис. 1. График рассеяния объектов при анализе корреляций (Spearman) между сроками пользования причинным типом ортопедических конструкций и результатами НСТ-теста с образцом 4 у пациентов с HCM ($R=0,77$; $p\leq 0,05$)
Fig. 1. Graph of object scattering in the analysis of correlations (Spearman) between the terms of use of the causal type of orthopedic structures and the results of the NST test with sample 4 in patients with NSM ($R=0,77$; $p\leq 0,05$)

Таблица 3
Метаболическая активность нейтрофилов крови пациентов контрольной группы (n=19) в НСТ-тесте под влиянием образцов СС
Table 3
Metabolic activity of blood neutrophils of patients of the control group (n=19) in the NST test under the influence of SS samples

Время инкубации образцов	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
30 дней	22 [19; 29]	22,5 [12; 34]	27,4 [20; 32]	25,5 [14; 30]

У пациентов контрольной группы увеличение метаболической активности нейтрофилов в индуцированном стафилококком НСТ-тесте составило 39,7 [31; 49], в спонтанном – 12 [9; 17] с ЗФР.

Как видно из табл. 3, изучаемые образцы также усиливали метаболическую активность нейтрофилов крови пациентов контрольной группы, однако в меньшей степени, чем у пациентов опытной группы ($p \leq 0,05$). Влияние изучаемых образцов на нейтрофилы пациентов контрольной группы можно объяснить тем, что пациенты пользовались ортопедическими конструкциями. Величина метаболической активности нейтрофилов у пациентов опытной и контрольной групп была связана со сроками пользования ортопедическими конструкциями.

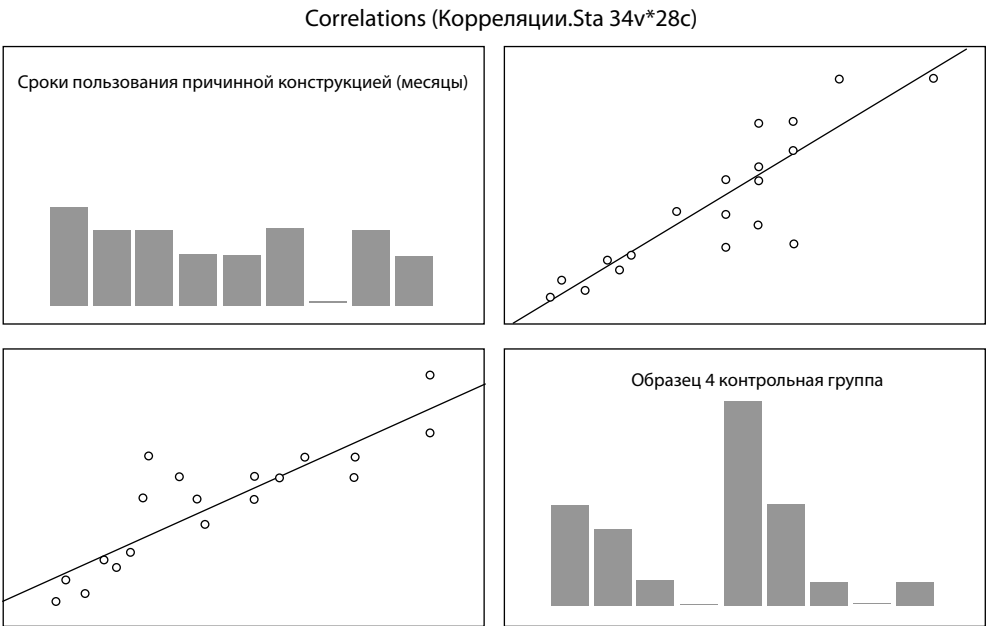


Рис. 2. График рассеяния объектов при анализе корреляций (Spearman) между сроками пользования причинным типом ортопедических конструкций и результатами НСТ-теста с образцом 4 у пациентов контрольной группы ($R=0,89$; $p \leq 0,05$)
Fig. 2. Graph of object scattering in the analysis of correlations (Spearman) between the timing of use of the causal type of orthopedic structures and the results of the NST test with sample 4 in patients of the control group ($R=0,89$; $p \leq 0,05$)



Несмотря на более низкие показатели метаболической активности нейтрофилов у пациентов контрольной группы под влиянием исследуемых образцов выявлена более сильная прямая корреляция между сроками пользования причинным типом ортопедических конструкций и результатами НСТ-теста с образцами 3 ($R=0,84$; $p \leq 0,05$) и 4 ($R=0,89$; $p \leq 0,05$) (рис. 2).

В связи с тем что СС для изготовления ортопедических конструкций содержат несколько разных ионов металлов, мы решили испытать влияние РСМ на метаболическую активность нейтрофилов крови пациентов.

Растворы каждой из солей металлов (0,001%) также в разной степени усиливали активность нейтрофилов в НСТ-тесте по сравнению с ЗФР, но в меньшей степени, чем культура убитого стафилококка. Из солей металлов наиболее сильно на метаболическую активность нейтрофилов влияла соль никеля, что, по-нашему мнению, связано с наибольшей распространенностью и аллергенностью никеля.

Следует отметить, что аналогичный эффект с РСМ (0,001%) наблюдался при испытании образцов 3 и 4 (табл. 2 и 4).

Значение НСТ-теста, индуцированного альбумином, составило 7,9 [5; 14], т. е. было сопоставимо со спонтанным.

Добавление ЧСА ко всем растворам солей металлов также статистически достоверно снижало влияние образцов на метаболическую активность нейтрофилов.

Существенные отличия получены при анализе результатов НСТ-теста с 0,001% РСМ, который достаточно сильно стимулировал метаболическую активность нейтрофилов, а его эффекты были сопоставимы с действием образцов 2–4 и 0,001% растворов NiCl_2 и TiO_2 .

Влияние на метаболическую активность нейтрофилов 0,001% растворов остальных солей металлов и образца 1 не имело отличий ($p \leq 0,05$). При сравнении эффектов

Таблица 4
Метаболическая активность нейтрофилов крови пациентов с НСМ (n=22) в НСТ-тесте под влиянием различных индукторов
Table 4
Metabolic activity of neutrophils of blood of patients with NSM (n=22) in the NST test under the influence of various inducers

Параметр	Только соли и образцы	Соли и образцы + ЧСА
CrCl_3 (0,001%)	19,2 [16; 23]	12,1 [3; 15]
CoCl_2 (0,001%)	23,5 [14; 26]	4,7 [2; 11]
MnSO_4 (0,001%)	16,1 [7; 24]	5,3 [3; 8]
ZnCl_2 (0,001%)	21,4 [16; 28]	4,3 [1; 4]
NiCl_2 (0,001%)	29,6 [23; 35]*	7,6 [5; 16]
CuCl_2 (0,001%)	12 [9; 14]	10,2 [5; 14]
MgSO_4 (0,001%)	18,7 [15; 30]	5,3 [4; 8]
TiO_2 (0,001%)	27,4 [20; 31]*	7,1 [4; 15]
PCM (0,001%)	34 [27; 45]*	10 [5; 13]
Образец 1 (30 дней)	27 [23; 30]	11 [7; 19]
Образец 2 (30 дней)	31,5 [22; 46]*	9 [6; 14]
Образец 3 (30 дней)	38 [31; 55]*	14 [9; 18]
Образец 4 (30 дней)	35 [20; 44]*	10,3 [5; 16]

Примечание: * $p \leq 0,05$.

отдельных растворов солей металлов оказалось, что эффекты растворов в концентрации 0,001% существенно не отличались, кроме NiCl_2 и TiO_2 .

Результаты определения фагоцитарной активности лейкоцитов

Растворы ионов металлов и их солей оказывали эффекты стимуляции или угнетения киллинга кандид лейкоцитами пациентов опытной и контрольной групп, но по-разному в зависимости от выбранного индуктора.

Образец 1 чаще ($p \leq 0,05$) стимулировал киллинг кандидат у 14 (63,3%) пациентов с HCM, а образец 2 – у 8 (36,3%). Угнетение киллинга образцом 1 наблюдалось у 4 (18,8%) пациентов, а образцом 2 – у 8 (36,3%), т. е. образец 2 чаще оказывал ингибирующий эффект и реже стимулирующий ($p \leq 0,05$). По-видимому, этот эффект связан с наличием TiN -напыления на образце 2. У остальных пациентов стимулирующая и угнетающая активность отсутствовала. Из вышесказанного следует, что наиболее частым эффектом на лейкоциты образца 1 была стимуляция, а образца 2 – ингибция киллинга кандидат ($p \leq 0,05$).

Образец 3 у 3 (13,6%) пациентов стимулировал, у 12 (54,6%) угнетал, а у 7 (31,8%) не влиял на киллинг кандидат (табл. 5), т. е. преобладающим эффектом было подавление киллинга ($p \leq 0,05$).

Образец 4 у 5 (22,7%) пациентов стимулировал, у 10 (45,5%) угнетал, а у 7 (31,8%) не влиял на киллинг кандидат, т. е. эффекты образцов 3 и 4 по частоте совпадали, следовательно, наиболее частым их эффектом на лейкоциты была ингибция киллинга кандидат ($p \leq 0,05$).

Обращает на себя внимание высокая частота встречаемости ингибции киллинга растворами образцов 3 и 4, что можно объяснить только особыми метаболическими или иммунологическими эффектами за счет наличия припоя.

Эффекты угнетения киллинга растворами образцов 3 и 4 совпали у 8 пациентов, а эффекты стимуляции – у 7, что указывает на их иммунологическую или метаболическую общность эффектов.

Стимуляция киллинга кандидат 0,01% РСМ наблюдалась у 5 (22,7%) пациентов, а 0,001% раствором – у 3 (13,6%), причем у 3 пациентов эффекты стимуляции киллинга 0,01% и 0,001% РСМ совпадали. То есть снижение концентрации РСМ в 10 раз не оказало влияния на стимуляцию киллинга. Ингибция киллинга кандидат 0,01% РСМ наблюдалась в 10 (45,5%) случаях, а 0,001% раствором – в 11 (50%).

Следовательно, как и при испытании образцов 3 и 4, РСМ в обеих концентрациях оказывал угнетающий киллинг-эффект (табл. 5).

Таблица 5
Влияние образцов СС и РСМ на киллинг кандидат лейкоцитами пациентов с HCM (n=22)
Table 5
Effect of SS and RSM samples on killing candida by leukocytes of patients with NSM (n=22)

Время инкубации образцов	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4	PCM 0,01%	PCM 0,001%
Стимуляция	14 (63,3%)*	8 (36,3%)	3 (13,6%)	4 (22%)	5 (22,7%)	3 (13,6%)
Угнетение	4 (18,8%)	8 (36,3%)*	12 (54,6%)*	9 (50%)*	10 (45,5%)*	11 (50%)*
Без эффекта	4 (18,8%)	6 (27,3%)	7 (31,8%)	5 (27,7%)	7 (31,8%)	8 (36,3%)

Примечание: * $p \leq 0,05$ между образцами.



Такие результаты указывают на чувствительность к стимулирующему или ингибирующему эффекту образцов СС и РСМ у пациентов с НСМ, так как наблюдалась у большинства из них.

Модификация одной из основных функций фагоцитоза – киллинга под влиянием КСМ может индуцировать как аллергию, так и иммунодефицит.

Таким образом, КСМ могут модифицировать фагоцитоз у пациентов. Чувствительность к стимуляции или ингибции КСМ киллинга кандид лейкоцитами зависит от качественного и количественного состава СС и содержимого его настаивания.

По-нашему мнению, КСМ, стимулируя нейтрофилы, вовлекают их в процесс биологического распада установленной в полость рта ортопедической конструкции, отсутствие влияния на их функцию КСМ может быть связано с формированием оральной толерантности к дентальным сплавам, а угнетение – вести к формированию иммунодефицита и хронического воспаления тканей СОР.

■ ВЫВОДЫ

1. Настойки стоматологических сплавов, содержащие их фрагменты, и 0,001% растворы солей металлов стимулировали метаболическую активность нейтрофилов в реакции восстановления нитротетразолиевого синего у пациентов с НСМ и без нее по сравнению со спонтанным НСТ-тестом ($p \leq 0,05$).
2. У пациентов с НСМ настойки стоматологических сплавов, содержащие их фрагменты, и 0,001% растворы солей металлов увеличивали активность нейтрофилов крови в НСТ-тесте ($p \leq 0,05$) наравне со взвесью убитого стафилококка, а у пациентов контрольной группы активность нейтрофилов в НСТ-тесте с исследуемыми веществами увеличивалась, но в меньшей степени, чем под влиянием взвеси стафилококка ($p \leq 0,05$).
3. Обнаружено, что присутствие ЧСА уменьшает влияние растворов металлов и их солей на метаболическую активность нейтрофилов ($p \leq 0,05$).
4. Установлена сильная корреляция между временем пользования ортопедическими конструкциями и усилением метаболической активности нейтрофилов в НСТ-тесте с растворами солей и ионов металлов у пациентов опытной и контрольной групп.
5. Настойки стоматологических сплавов, содержащие их фрагменты, и 0,001% растворы солей металлов у пациентов с НСМ могли стимулировать или ингибировать киллинг кандид лейкоцитами пациентов.

■ ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Thomas P., Braathen L.R., Dörig M., Auböck J., Nestle F., Werfel T., Willert H.G. Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation. *Allergy*. 2009;64(8):1157–65. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2009.01966.x
2. Frigerio E, Pigatto PD, Guzzi G, Altomare G. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants: a prospective study. *Contact Dermatitis*. 2011;64(5):273–79. DOI: 10.1111/j.1600-0536.2011.01886.x.
3. Karpuk I.Yu., Novikov D.K. Detection of allergies and hypersensitivity to metal salts by determining the level of potassium ions in the oral fluid. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2016;3:21–30. (in Russian)
4. Granchi D., Ciapetti G., Savarino L., Stea S., Filippini F., Sudanese A., Rotini R., Giunti A. Expression of the CD69 activation antigen on lymphocytes of patients with hip prosthesis. *Biomaterials*. 2000;21(20):2059–65. DOI: 10.1016/s0142-9612(00)00099-5.
5. Kawano M., Nakayama M., Aoshima Y., Nakamura K., Ono M., Nishiyama T., Nakamura S., Takeda Y., Dobashi A., Takahashi A., Endo M., Ito A., Ueda K. γ NKGD2D(p) IFN- γ CD8(p) T cells are responsible for palladium allergy. *PLoS ONE*. 2014;9:1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0086810.
6. Karpuk N.A., Karpuk I.Yu. Diagnosis of Allergy to Metal Products in the Reaction of Allergen-Induced Damage to Leukocytes. *Meditinskiye Novosti*. 2012;6:75–76. (in Russian)

7. Asif K., Kothiwale S.V. Phagocytic activity of peripheral blood and crevicular phagocytes in health and periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol.* 2010;14(1):8–11. DOI: 10.4103/0972-124X.65427.
8. Ryder M.I. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontology 2000.* 2010;53(1):124–137. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2009.00327.x.
9. Kumazawa R., Watari F., Takashi N., Tanimura Y., Uo M., Totsuka Y. Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology. *Biomaterials.* 2002;23:3757–3764. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00115-1.
10. Karpuk N.A., Karpuk I.Yu. Complex diagnostics of metal allergy in patients with metal intolerance. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2012;2:80–88.
11. Banerjee A., Lahiri S. Albumin metal interaction: a multielemental radiotraitdet study. *Journal of Radioablytical and Nuclear Chemistry.* 2009;279(3):733–741.
12. Bonefeld C.M., Nielsen M.M., Vennegaard M.T., Johansen J.D., Geisler C., Thyssen J.P. Nickel acts as an adjuvant during cobalt sensitization. *Exp Dermatol.* 2015;24(3):229–31. DOI: 10.1111/exd.12634.
13. Karpuk N.A., Karpuk I.Yu. Violation of oral tolerance to the components of dental materials by activating lymphocytes. *Stomatologiya. Estetika. Innovatsii.* 2018;2(3):363–371.
14. Liao S., Tamura K., Zhu Y., Wang W., Uo M., Akasaka T., Cui F., Watari F. Human neutrophils reaction to the biodegraded nano-hydroxyapatite/collagen and nano-hydroxyapatite/collagen/poly (L-lactic acid) composites. *J Biomed Mater Res A.* 2006;76(4):820–25. DOI: 10.1002/jbm.a.30582.