



Карпук И.Ю.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь

Лейкоцитарные биомаркеры гиперчувствительности к компонентам стоматологических материалов при гингивите

Конфликт интересов: не заявлен.

Работа подготовлена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № ГР 20221321 от 01.08.2022 (02.08.2022 09:42).

Подана: 05.09.2023

Принята: 15.09.2023

Контакты: ikarpuk@mail.ru

Резюме

Введение. Несмотря на внедрение в клиническую практику широкого спектра методов диагностики аллергии на стоматологические материалы, соответствующих тем или иным звеньям патогенеза, важной и нерешенной проблемой остается поиск лабораторных маркеров, сопровождающих воспалительно-деструктивные изменения в тканях при непереносимости стоматологических материалов.

Цель. Изучить уровни α -дефензинов и ММП-8 у пациентов с жалобами на непереносимость стоматологических материалов.

Материалы и методы. Проведено обследование 20 пациентов с жалобами на НСМ в возрасте от 44 до 68 лет, из них 2 мужчин и 18 женщин. У всех пациентов выявлены причинно-следственная связь между возникновением симптомов непереносимости зубопротезного материала и фактом контакта с ним, а также положительные результаты постановки аппликационных проб (АП).

В контрольную группу вошли 19 пациентов (2 мужчин и 17 женщин) без жалоб на НСМ. Все пациенты, включенные в исследование, дали и собственноручно заполнили добровольное информированное согласие на участие в работе.

Результаты и обсуждение. У пациентов с НСМ аллергической этиологии ($n=20$), доказанной аппликационными пробами с солями металлов, показатели среднего уровня α -1-дефензина в РЖ до снятия причинных ортопедических конструкций составили 1,56 [1,19; 1,95] нг/мл, а спустя 1 месяц после снятия – 0,61 [0,44; 0,68] нг/мл ($P_{\text{Wilcoxon}} \leq 0,05$).

Система протеолиза, включающая в себя семейство матриксных металлопротеиназ, характеризуется увеличением активности ММП-8 в РЖ пациентов с НСМ (33,3 мг/мл) по сравнению с контрольной группой (9 мг/мл).

Выводы. Результаты исследования свидетельствуют о возможности применения в качестве биомаркера гиперчувствительности к дентальным сплавам α -1-дефензина и ММП-8.

Ключевые слова: ротовая жидкость, гиперчувствительность, биомаркеры, стоматологические материалы



Karpuk I.

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

Leukocyte Biomarkers of Hypersensitivity to Components of Dental Materials in Gingivitis

Conflict of interest: nothing to declare.

This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research No. GR 20221321 of 01.08.2022 (02.08.2022 09:42).

Submitted: 05.09.2023

Accepted: 15.09.2023

Contacts: ikarpuk@mail.ru

Abstract

Introduction. Despite the introduction into clinical practice of a wide range of methods for diagnosing allergies to dental materials corresponding to various links of pathogenesis, an important and unresolved problem remains the search for laboratory markers accompanying inflammatory and destructive changes in tissues with intolerance to dental materials.

Purpose. To study the levels of α -defensins and MMP-8 in patients with complaints of intolerance to dental materials.

Materials and methods. 20 patients were examined with complaints of SCI aged 44 to 68 years, of which 2 were men and 18 were women. All patients showed a causal relationship between the onset of symptoms of intolerance to dental material and the fact of contact with it, as well as positive results of application tests (AP).

The control group included 19 patients (2 men and 17 women) without complaints of SCI. All patients enrolled in the study gave and personally completed voluntary informed consent to participate in the work.

The results and discussion. In patients with SCI of allergic etiology ($n=20$), proven by application samples with metal salts, the average level of α -1-defensin in the BC before removal of causal orthopedic constructs was 1.56 [1.19; 1.95] ng/mL, and 1 month after removal – 0.61 [0.44; 0.68] ng/mL (PWilcoxon ≤ 0.05).

The proteolysis system, which includes a family of matrix metalloproteinases, is characterized by an increase in MMP-8 activity in the OL of patients with SCI (33.3 mg/mL) compared to the control group (9 mg/mL).

Conclusion. The results of the study indicate the possibility of using hypersensitivity to dental alloys α -1-defensin and MMP-8 as a biomarker.

Keywords: oral fluid, hypersensitivity, biomarkers, dental materials

■ ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на внедрение в клиническую практику широкого спектра методов диагностики аллергии на стоматологические материалы, соответствующих тем или иным звеньям патогенеза, важной и нерешенной проблемой остается поиск лабораторных маркеров, сопровождающих воспалительно-деструктивные изменения в тканях при непереносимости стоматологических материалов (HCM) [1–4].

Ротовая жидкость (РЖ) содержит многочисленные белки, в том числе дефензины, которые играют важную роль в формировании как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Уровни дефензинов в РЖ могут меняться, и, следовательно, они могут быть маркером для оценки риска и ранней диагностики патологических состояний, связанных с воздействием на слизистую оболочку ротовой полости (СОРП). Поскольку каждый зубной протез является для организма инородным телом и сильным раздражителем, то особенно важно учитывать, что различные конструкции зубных протезов неравнозначно влияют на концентрацию антимикробных пептидов [5, 6].

Действие дефензинов на систему иммунитета реализуется за счет хемоаттракции различных клеток (CD8 Т-лимфоцитов моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, тучных клеток [7], Т-клеток памяти и базофилов [8], незрелых CD34+ дендритных клеток, Th17 и регуляторных (Treg) клеток. Показано, что дефензины также способны мощно активировать фагоцитоз и индуцировать продукцию IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ моноцитами факторов роста (гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), фактора роста нервов (NGF)), а также субстанции Р, простагландина E2, лейкотриена LTC4 тучными клетками. Таким образом, дефензины являются важными адъювантами защитной системы организма человека, гармонизирующими и регулируемыми выраженность и направленность иммунного ответа [9].

α -дефензины (HNP1, HNP2, HNP3, HNP4) продуцируются нейтрофилами и представлены в РЖ и жидкости зубодесневой борозды [10].

Деструкция тканей поддерживающего аппарата зуба происходит вследствие деградациии компонентов экстрацеллюлярного матрикса и приводит к необратимой потере соединительной ткани периодонта и альвеолярной кости. По данным ряда авторов [11], важную роль в данном патологическом процессе играют матриксные металлопротеиназы (ММП). ММП-8 – цинкзависимые эндопептидазы, выделяемые в основном нейтрофилами [12].

Семейство ММП рассматривается в качестве одних из основных действующих ферментов системы протеолиза, участвующих в различных патогенетических вариантах воспаления, сердечно-сосудистых заболеваний, инфекционных, аутоиммунных и аллергических реакций, злокачественной трансформации клеток [13, 14].

Именно поэтому углубленное изучение влияния неблагоприятного действия стоматологических материалов на уровни α -дефензинов и ММП-8 в РЖ вызывает научный интерес. Понимание их роли даст возможность лучше понять механизмы патогенеза гиперчувствительности у таких пациентов и использовать новейшие диагностические методы для ее выявления на ранних этапах.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить уровни α -дефензинов и ММП-8 у пациентов с жалобами на непереносимость стоматологических материалов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 20 пациентов с жалобами на HCM и гингивитом в возрасте от 44 до 68 лет, из них 2 мужчин и 18 женщин. У всех пациентов выявлены причинно-следственная связь между возникновением симптомов непереносимости зубопротезного материала и фактом контакта с ним, а также положительные результаты постановки аппликационных проб (АП).



В контрольную группу вошли 19 пациентов (2 мужчин и 17 женщин) без жалоб на НСМ.

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

Сформированные группы были сопоставимы по возрастной и половой категориям, количеству зубопротезных единиц, виду ортопедических конструкций и срокам пользования ими.

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

Аппликационное наковое тестирование с растворами солей металлов

Всем участникам исследования в двух группах осуществлялась постановка аппликационного накового тестирования с растворами солей металлов в различных концентрациях на вазелиновой основе, с использованием в качестве аппликатора лейкопластыря Унипласт Фиксирующий 5×500 см. Результаты постановки АП оценивались через 3, 24 и 48 часов. Использованы следующие соли: NiCl_2 (3%), CrCl_3 (3%), CoCl_2 (1%). Обновление диагностических растворов проводили не реже чем через 2–3 недели.

В качестве негативного контроля использовался чистый медицинский вазелин.

Интерпретация результатов кожного тестирования проводилась согласно общепринятой методике [16].

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

Исследование одобрено этическим комитетом Витебской областной клинической больницы.

Забор и подготовка РЖ для определения уровней α -1-дефенинов

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

Методика забора и подготовки к исследованию ротовой жидкости. Проба № 1 забиралась в момент обращения и спустя 1 месяц после снятия причинных конструкций (проба № 2).

Ротовую жидкость (РЖ) получали с 9 до 11 часов дня путем сплевывания в стерильные пробирки без стимуляции утром, натощак, без предварительной чистки зубов. РЖ хранили в жидком азоте.

Образцы РЖ (1–1,5 мл) центрифугировали при 7000 об/мин в течение 20 минут. Далее пробы фильтровали через фильтры шприцевые Corning® с мембраной из полиэфирсульфона PES, 0,22 мкм, 28 мм, стерильные, в индивидуальной упаковке.

Определение уровня Human DEFA1 (Defensin Alpha 1, Neutrophil) осуществляли с использованием ИФА тест-системы (номер по каталогу E-EL-H0833).

Определение MMP-8

В качестве материала для исследований использовалась ротовая жидкость. Содержание в слюне матриксных металлопротеиназ, нейтрофильной эластазы, ингибитора металлопротеиназ определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы RsD Systems (США) с оценкой результатов на вертикальном фотометре Multiscan с последующей обработкой результатов компьютерной программой Genesis.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась при помощи STATISTICA 10.0. Количественные параметры представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного 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 И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение и клиническое значение α-1-дефензинов в РЖ пациентов с HCM и гингивитом

Углубленное изучение влияния неблагоприятного действия стоматологических материалов на уровни α-дефензинов в РЖ вызывает научный и практический интерес. Эти пептиды не только участвуют в антимикробной защите, но и характеризуют состояние нейтрофилов.

У пациентов с HCM аллергической этиологии (n=20) (с положительными результатами постановки АП к солям металлов) показатели среднего уровня α-1-дефензина в РЖ до снятия причинных ортопедических конструкций составили 1,56 [1,19; 1,95] нг/мл, а спустя 1 месяц после снятия – 0,61 [0,44; 0,68] нг/мл (табл. 1). Следовательно, устранение ортопедических конструкций снижало уровень α-1-дефензина в РЖ.

Таблица 1
Показатели среднего уровня α-1- и β-1-дефензинов в ротовой жидкости у пациентов с HCM и гингивитом до и после снятия причинных ортопедических конструкций (n=20)

Table 1
Mean α-1- and β-1-defensins in oral fluid in patients with SCI and gingivitis before and after removal of causal orthopedic constructs (n=20)

Уровень (нг/мл)	Median	25%o	75%o	P Wilcoxon
α-1-дефензина в РЖ до снятия	1,56	1,19	1,95	0,0001
α-1-дефензина в РЖ после снятия	0,61	0,44	0,68	



Таблица 2
Показатели среднего уровня α-1- и β-1-дефензинов в ротовой жидкости у пациентов контрольной группы до и после снятия ортопедических конструкций (n=20)
Table 2
Mean α-1- and β-1-defensin levels in oral fluid in control patients before and after orthopedic construction removal (n=20)

Уровень (нг/мл)	Median	25% _o	75% _o	P _{Wilcoxon}
α-1-дефензина в РЖ до снятия	0,57	0,43	0,69	0,26
α-1-дефензина в РЖ после снятия	0,58	0,46	0,73	

По нашему мнению, снижение уровня α-1-дефензина в РЖ после снятия протезов может быть связано с гиперчувствительностью нейтрофилов к компонентам дентальных сплавов, так как основным источником α-1-дефензина являются азурофильные гранулы нейтрофилов.

Уровень α-1-дефензина в РЖ у пациентов контрольной группы (n=19) до снятия ортопедических конструкций составил 0,57 [0,43; 0,69] нг/мл, а спустя 1 месяц после снятия – 0,58 [0,46; 0,73] нг/мл. Исходный уровень α-1-дефензина в этой группе (0,57 нг/мл) был существенно ниже ($p_{\text{Mann-Whitney}} < 0,05$), чем в первой группе (1,56 нг/мл), что указывает на влияние ортопедических конструкций на выброс α-1-дефензина нейтрофилами у пациентов с гиперчувствительностью (табл. 2).

Исходя из полученных данных, можно судить о том, что уровень α-1-дефензина в РЖ позволяет объективно оценивать влияние зубопротезных материалов на гиперреактивность нейтрофильных лейкоцитов.

У пациентов первой группы с развитием HCM, с более выраженной симптоматикой и выявленной сенсибилизацией к ионам металлов по АП уровень α-дефензинов в РЖ был выше, чем у пациентов контрольной группы.

По изменению уровня α-1-дефензина в РЖ до и после снятия причинных конструкций можно делать выводы об участии нейтрофилов в патогенезе гиперчувствительности к дентальным сплавам. У пациентов с HCM предположительно аллергического происхождения отмечается снижение концентрации α-1-дефензина в РЖ через месяц после снятия протезов по сравнению с исходным уровнем.

Описанные нами высокая биологическая активность α-1-дефензина, его специфичность обусловили интерес к изучению данного пептида и дали возможность использовать в диагностике и прогнозировании рисков развития аллергии на дентальные сплавы.

Значение нейтрофильных матриксных металлопротеиназ-8 в развитии непереносимости стоматологических материалов

Анализ изученных показателей выявил наиболее выраженные изменения в группах пациентов с аллергией на зубопротезные материалы: более высокие уровни металлопротеиназ-8 (табл. 3).

В группе пациентов с HCM и гингивитом уровни ММП-8 составили соответственно 33,3 мкг/мл (в контрольной группе – 9 мкг/мл и 14 мкг/мл).

Корреляционный анализ полученных данных между результатами клинического обследования пациентов и уровнями ММП-8 выявил следующие зависимости:

- 1) прямую умеренную корреляцию между наличием соматической патологии и уровнем ММП-8 ($R=0,46$; $p=0,01$);

Таблица 3
Среднее значение уровней ММП-8 в РЖ у пациентов с HCM и гингивитом и пациентов контрольной группы
Table 3
Mean MMP-8 levels in OL in patients with BCM and gingivitis and controls

	Пациенты с HCM	Пациенты контрольной группы
ММП-8 (мкг/мл)	33,3*	9

Примечание: * отличие между группами с $p_{\text{Mann-Whitney}} < 0,05$.

Таблица 4
Значимые корреляции (Spearman) ММП-8 в РЖ с другими параметрами у пациентов с HCM и гингивитом
Table 4
Significant correlations (Spearman) of MMP-8 in OL with other parameters in patients with SCI and gingivitis

Изучаемые параметры	ММП-8 (мкг/мл)	p-level
Наличие соматической патологии	0,46	0,01
Количество зубопротезных единиц	0,72	0,001
Сроки пользования зубными протезами	0,52	0,001

- 2) прямую сильную корреляцию между количеством зубопротезных единиц и уровнем ММП-8 ($R=0,72$; $p=0,001$);
- 3) прямую умеренную корреляцию между сроками пользования зубными протезами и уровнями ММП-8 ($R=0,52$; $p=0,001$) (табл. 4).
- Таким образом, определение уровней α -1-дефензина и ММП-8 может применяться в качестве биомаркера гиперчувствительности к дентальным сплавам.

■ ВЫВОДЫ

1. У пациентов с HCM ($n=20$), доказанной аппликационными пробами с солями металлов, и гингивитом показатели среднего уровня α -1-дефензина в РЖ до снятия причинных ортопедических конструкций составили 1,56 [1,19; 1,95] нг/мл, а спустя 1 месяц после снятия – 0,61 [0,44; 0,68] нг/мл ($P_{\text{Wilcoxon}} \leq 0,05$).
2. Система протеолиза, включающая в себя семейство матриксных металлопротеиназ, характеризуется увеличением активности ММП-8 в РЖ пациентов с HCM и гингивитом (33,3 мг/мл) по сравнению с контрольной группой (9 мг/мл).

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Karpuk I., Novikov D. (2016) Vyjavlenie allergii i giperchuvstvitel'nosti k soljam metallov putem opredelenija urovnja ionov kalija v rotovoj zhidkosti [Detection of allergies and hypersensitivity to metal salts by determining the level of potassium ions in the oral fluid]. *Immunopatologija, allergologija, infektologija*, no 3, pp. 21–30. (in Russian)

2. Karpuk I. (2014) Immunopatologija u pacientov s ortopedicheskimi konstrukcijami v polosti rta [Immunopathology in patients with orthopedic constructions in the oral cavity]. *Vestn. VGMU*, vol. 13, no 4, pp. 29–35. (in Russian)

3. Karpuk I., Fadeev V. (2017) Vydelenie ionov metallov iz stomatologicheskikh splavov i ih vlijanie na metabolicheskiju i killingovuju aktivnost' lejkocitov [Isolation of metal ions from dental alloys and their effect on the metabolic and killing activity of leukocytes]. *Immunopatologija, allergologija, infektologija*, no 3, pp. 6–21. (in Russian)

4. Karpuk I., Karpuk N. (2018) Klinicheskoe znachenie triptazy v razvitii neperenosimosti stomatologicheskikh materialov [Clinical significance of tryptase in the development of intolerance to dental materials]. *Stomatologija. Jestetika. Innovacii*, vol. 2, no 2, pp. 232–242. (in Russian)



5. Karpuk I. (2015) Znamenie matriksnyh metalloproteinaz-8 i -9 v razvitii allergopatologii slizistoj obolochki polosti rta, vyzvannoj neperenosimost'ju zuboproteznyh materialov [Significance of matrix metalloproteinases-8 and -9 in the development of allergopathology of the oral mucosa caused by intolerance to denture materials]. *Vestn. VGMU*, vol. 14, no 2, pp. 89–96. (in Russian)
6. Ivanova O., Karpuk I., Denisova Ju. (2021) Rasprostranennost' gingivito v u pacientov, nahodjashhihsja na ortodonticheskom lechenii, s Covid-19 v anamneze [Prevalence of gingivitis in orthodontic patients with a history of Covid-19]. *Stomatologija. Jestetika. Innovacii*, vol. 5, no 1, pp. 68–74. (in Russian)
7. Kucukkolbasi H., Kucukkolbasi S., Ayyildiz H.F., Dursun R., Kara H. (2013) Evaluation of hbetaD-1 and hbetaD-2 levels in saliva of patients with oral mucosal diseases. *West Indian Med J*, vol. 62, no 3, pp. 230–238.
8. Hollox E.J. (2008) Copy number variation of beta-defensins and relevance to disease. *Cytogenet Genome Res*, vol. 123, no 1–4, pp. 148–155. doi: 10.1159/000184702
9. Nishi Y., Isomoto H., Mukae H., Ishimoto H., Wen C.Y., Wada A., Ohnita K., Mizuta Y., Murata I., Hirayama T., Nakazato M., Kohno S. (2005) Concentrations of α - and β -defensins in gastric juice of patients with various gastroduodenal diseases. *World J Gastroenterol*, 2005, vol. 11, no 1, pp. 99–103. doi: 10.3748/wjg.v11.i1.99
10. Sawaki K., Mizukawa N., Yamaai T., Fukunaga J., Sugahara T. (2002) Immunohistochemical study on expression of alpha-defensin and beta-defensin-2 in human buccal epithelia with candidiasis. *Oral Dis*, vol. 8, no 1, pp. 37–41. doi: 10.1034/j.1601-0825.2002.10770.x
11. Kiili M., Cox S.W., Chen H.Y., Wahlgren J., Maisi P., Eley B.M., Salo T., Sorsa T. (2002) Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol*, vol. 29, no 3, pp. 224–232. doi: 10.1034/j.1600-051x.2002.290308.x
12. Séguier S., Gogly B., Bodineau A., Godeau G., Brousse N. (2001) Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol*, vol. 72, no 10, pp. 1398–1406. doi: 10.1902/jop.2001.72.10.1398
13. Verstappen J., Von den Hoff J.W. (2006) Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): Their Biological Functions and Involvement in Oral Disease. *J Dent Res*, vol. 85, no 12, pp. 1074–1084. doi: 10.1177/154405910608501202
14. Dahan M., Nawrocki B., Elkaïm R., Soell M., Bolcato-Bellemin A.L., Birembaut P., Tenenbaum H. (2001) Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *J Clin Periodontol*, vol. 28, no 2, pp. 128–136. doi: 10.1034/j.1600-051x.2001.028002128.x