

Исследование влияния стоматологических материалов на гистаминолиберацию базофилов крови *in vitro*

Л.В. ДУБОВА*, к.м.н., доц.

И.Ю. ЛЕБЕДЕНКО*, з.д.н. РФ, д.м.н., зав. кафедрой

М.В. БЫКОВА*, к.м.н., доц.

А.А. БАБАХИН, д.б.н., зав. лаборатории ГБУ ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России»

*Кафедра госпитальной ортопедической стоматологии МГМСУ

Research of influence of stomatologic materials on liberation histamine basofile cells blood *in vitro*

L.V. DUBOVA, I.Yu. LEBEDENKO, M.V. BYKOVA

Резюме

В статье показано, что применение метода гистаминолиберации базофилов крови к образцам материалов, используемых в стоматологии, выявило наиболее высокий уровень высвобождения гистамина на образцы корневой пасты «Форедент». Образцы «Сеалит регуляр», «Цинкоксидэвгенол», сплавов металлов «Суперпал» и «Супер КМ» не оказывают повреждающего действия на эти клетки крови.

Ключевые слова: гистамин, базофилы, супернатант, стоматологические материалы, atopическая аллергия, пломбирование корневых каналов.

Abstract

In given clause application of a method of liberation histamin basofile cells has been shown, that to blood to samples of the materials used in stomatology, has revealed the highest level of liberation histamin on samples of root paste Foredent. Samples Sealite Regular, Zinc oxide eugenole, alloys of metals Superpal and Super KM do not render damaging action on these blood cells.

Key words: histamine, basophile cells, supernatante, stomatologic materials.

Число аллергических заболеваний и осложнений во всем мире постоянно растет, занимая важное место в структуре инфекционной и неинфекционной патологии (De Weck A. L., 2000). Источником сенсibilизации чаще всего являются пылевые, бытовые, эпидермальные, пищевые аллергены, а также гаптены. В качестве гаптенов могут выступать различные химические вещества, включая содержащиеся в применяемых в стоматологии материалах, которые, соединяясь с белковым носителем, выступающим в роли адьюванта, становятся иммуногенными (Cox J. C., Coulter A. R., 1997; Зайченко О. В., 2003). Далее происходит интернализация, процессинг и презентация (ассоциированных с молекулами МНС

II класса) соединившихся с растворимыми белками гаптенов.

Показано, что стоматологические материалы (СМ), находящиеся в полости рта длительное время, могут модулировать существующий иммунный ответ организма к различным аллергенам у больных с atopическими аллергическими заболеваниями. С другой стороны, СМ могут воздействовать на клетки слизистой оболочки полости рта, в частности на тучные клетки, что может вести к неспецифическому высвобождению гистамина – одного из основных медиаторов аллергического воспаления. Согласно последним данным, гистамин обладает модулирующими свойствами в отношении Th2-профиля лимфокинов, что приводит к формированию аллергического Th2-

фенотипа. Поэтому представляется исключительно важным предварительное скринирование материалов, предназначенных для стоматологических манипуляций, на безопасность и в частности, на гистаминовысвобождающую активность по отношению к базофилам крови (Babakhin A. A. et al., 2000).

В связи с вышеизложенным, в настоящей работе проводилось изучение *in vitro* действия различных сплавов металлов и акриловых пластмасс, используемых в ортопедической стоматологии, а также реставрационных композитных материалов и паст для пломбирования корневых каналов зубов на высвобождение гистамина из базофилов цельной крови здоровых доноров и больных atopической аллергией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были исследованы образцы капиллярной крови у 125 пациентов с atopической аллергией (АА), из которых 44 человека имели в анамнезе заболевание бронхиальная астма и 81 человек – аллергический ринит. Контрольную группу ($n = 30$) составили пациенты без АА.

Изучение гистаминвысвобождающей активности СМ проводили в двух вариантах. Первый предусматривал предварительную инкубацию 30 мг мелкой стружки, полученной из сплавов металлов, предварительно обработанных твердосплавной фрезой, с 300 мл крови в течение часа при температуре 37°C. Согласно второму варианту «супернатанты» материалов готовили по методике Pelka М. с соавт. (2000) в нашей модификации. Все другие СМ (готовые образцы акриловых пластмасс, корневых паст и композитных материалов светового отверждения) были измельчены до порошкообразного состояния. Порошкообразный образец каждого СМ весом 125 мг помещали в стерильные полипропиленовые пробирки и заливали 1 мл стерильного PIPES буфера ($C_2H_2O_2Na \cdot 3H_2O$; K_2CO_3 ; Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid]; Tris[hydroxymethyl]aminomethane; $CaCl_2 \cdot H_2O$; KCl) (Sigs). Взвесь периодически перемешивали на магнитной мешалке в течение 48 ч. при 37°C и центрифугировали при 1250 об/мин в течение 15 мин. Полученные «супернатанты» до начала исследования хранили при температуре +4°C не более 2-3 дней.

Определение высвободившегося гистамина после инкубации цельной крови с полученными «супернатантами» проводили по нашей методике (Бабахин А. А. с соавт., 2000), которая заключалась в следующем: капиллярную гепаринизированную кровь в объеме 25 мкл помещали в ячейки 96-луночных планшет, куда предварительно добавляли согласно стандартной конфигурации по 25 мкл «супернатантов» СМ, положительного и отрицательного контролей или только PIPES-буфера. В качестве поло-

жительного контроля использовали: 1) анти-IgE (Dako) в трех стандартных разведениях (1:80; 1:280; 1:400); 2) кальциевый ионофор A23187 (Sigma) в трех концентрациях (62,5 мкг/мл, 31,25 мкг/мл и 15,67 мкг/мл). В качестве отрицательного контроля кровь инкубировали только с PIPES-буфером. Далее образцы инкубировали в течение 1 ч. при 37°C, промывали ячейки дистиллированной водой, добавляли 0,04% раствор SDS (Sodium dodecyl sulfate) и снова инкубировали в течение 30 мин. при 37°C. После инкубации ячейки вновь промывали дистиллированной водой и в каждую ячейку добавляли раствор ортофталатидевого диальдегида (Sigma) для конденсации гистамина, сорбированного на стекловолоконном матриксе. Реакцию останавливали через 10 мин. путем добавления стоп-раствора (0,59% $HClO_4$). Полученные результаты выражали в нг/мл. Чувствительность метода составляла 5 нг/мл.

На основании данных анализа содержания гистамина в каждой из шести ячеек, куда был помещен один и тот же «супернатант», рассчитывали среднее значение гистаминолиберации по каждому «супернатанту» для каждого пациента. Затем высчитывали среднее значение высвобождения гистамина в группах здоровых доноров и больных аллергией, то есть сколько гистамина выделяется базофилами, содержащимися в 1 мл крови, под влиянием СМ.

Полученные данные представлены как среднее и стандартное отклонение для нормального распределения и как медиана и интерквартильный размах для распределения, отличного от нормального. Значимость различий для количественных переменных между группами оценивалась по критерию Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение гистаминолиберации из базофилов крови больных АА под воздействием реставрационных стоматологических мате-

риалов показало значительное высвобождение гистамина только в случае инкубации «супернатантов», полученных из образца «Филтек». Во всех остальных случаях высвобождение гистамина из базофилов крови было на уровне значений контроля (инкубация с PIPES-буфером). Так, при инкубации с образцами «Призмафил» хотя и определялось небольшое количество гистамина, но это увеличение было недостоверным ($p > 0,1$). Сходные величины гистаминолиберации были получены при инкубации тех же «супернатантов» с кровью здоровых доноров.

При анализе полученных результатов по высвобождению гистамина из базофилов цельной крови под воздействием «супернатантов» паст для пломбировки каналов выявлено, что высокий уровень высвобождения гистамина, как у больных с АА, так и у здоровых доноров, показал образец «супернатанта» пасты «Форедент». Меньший уровень высвобождения гистамина из базофилов крови отмечался при инкубации крови больных АА и здоровых доноров с образцами корневой пасты «Эндометазон». Образцы паст «Цинкоксидэвгенол» и «Сеалит Регуляр» при инкубации как с кровью больных АА, так и здоровых людей практически не вызывали высвобождение гистамина, и цифры были сопоставимы с уровнем отрицательного контроля (PIPES-буфера).

Инкубация «супернатантов» пластмасс с базофилами здоровых пациентов (не сенсибилизированных к atopическим аллергенам) вызывала гистаминолиберацию. Так, «Этакрил», полученный термополимеризацией, давал более высокий уровень высвобождения гистамина по сравнению с «Стомакрилом» и «Фтораксом», полученными тем же способом. В то же время инкубация образцов «Фторакс»-СВЧ с базофилами сопровождалась незначительной гистаминолиберацией, а образцы «Стомакрил»-СВЧ и «Этакрил»-СВЧ практически не вызывали высвобождение гистамина (табл. 1). Инкубация «супернатантов» пластмасс с базофила-

Таблица 1. Высвобождение гистамина (нг/мл) из базофилов крови пациентов с atopической аллергией после ее инкубации с супернатантами различных СМ, применяемых в стоматологии ($M \pm m$)

Супернатанты СМ	Группы пациентов			
	Пациенты с АА		Пациенты без АА	
	n = 125	P	n = 30	P
«Филтек»	16,5 ± 1,30	< 0,001; p ¹ > 0,1	17,1 ± 1,25	< 0,001
«Призмафил»	6,10 ± 1,33	> 0,1; p ¹ > 0,1	5,50 ± 0,95	> 0,1
«Геркулайт»	4,30 ± 1,20	> 0,5; p ¹ > 0,1	4,10 ± 0,55	> 0,1
PIPES	3,70 ± 0,50		3,75 ± 0,45	
«Эндометазон»	12,9 ± 1,88	< 0,001; p ¹ > 0,1	11,9 ± 1,99	< 0,001
«Цинкоксидэвгенол»	2,84 ± 0,38	> 0,1; p ¹ > 0,5	2,55 ± 0,49	> 0,1
«Форедент»	39,5 ± 6,27	< 0,001; p ¹ > 0,05	35,9 ± 7,15	< 0,001
«Сеалит регуляр»	4,02 ± 1,28	> 0,1; p ¹ > 0,5	4,60 ± 0,91	> 0,1
PIPES	3,44 ± 0,42		3,06 ± 0,40	
«НС»	1,62 ± 0,39	> 0,1; p ¹ > 0,5	1,92 ± 0,25	> 0,1
«Бюгодент»	1,97 ± 0,32	> 0,1; p ¹ > 0,1	2,06 ± 0,15	> 0,1
«Супер КМ»	2,42 ± 0,23	> 0,05; p ¹ > 0,05	3,12 ± 0,40	> 0,05
«Суперпал»	2,60 ± 0,50	> 0,05; p ¹ > 0,1	2,48 ± 0,77	> 0,1
PIPES	1,60 ± 0,41		1,92 ± 0,47	
«Этакрил»-ВБ	52,0 ± 0,81	< 0,001; p ¹ > 0,5	49,8 ± 0,66	< 0,001
«Этакрил»-СВЧ	3,22 ± 1,51	> 0,1; p ¹ > 0,1	2,90 ± 0,81	> 0,1
«Фторакс»-ВБ	2,22 ± 1,04	> 0,1; p ¹ > 0,1	2,22 ± 0,47	> 0,1
«Фторакс»-СВЧ	11,2 ± 0,43	< 0,001; p ¹ < 0,05	9,20 ± 0,58	< 0,001
«Стомакрил»-ВБ	1,70 ± 0,91	> 0,1; p ¹ > 0,1	1,50 ± 0,57	> 0,1
«Стомакрил»-СВЧ	2,65 ± 1,13	> 0,1; p ¹ > 0,1	2,38 ± 0,73	> 0,1
PIPES	2,32 ± 0,45		1,98 ± 0,22	

p – по сравнению с контролем (инкубация только с PIPES-буфером);

p¹ – между пациентами здоровыми и с atopической аллергией

ми у пациентов с atopической аллергией также давала высокий уровень гистаминолиберации на «Этакрил»-ВБ. При этом количество высвобождаемого гистамина хотя и было несколько выше по сравнению с пациентами без аллергии, но эти отличия были недостоверны. Подобная тенденция наблюдалась при исследовании образцов, содержащих «Стомакрил»-ВБ. В случае же инкубации крови с супернатантами «Фторакс»-СВЧ имелось достоверное увеличение осво-

бождения гистамина из базофилов крови, p < 0,05 по сравнению со здоровыми пациентами.

Инкубация образцов «НС» и сплавов металлов «Бюгодент», «Суперпал», «Супер КМ» с кровью пациентов без аллергии и страдающих АА не приводила к достоверным изменениям в освобождении гистамина в обеих группах. Количество высвобождаемого гистамина из базофилов крови под влиянием сплавов металлов было сопоставимо между группами.

Таким образом, наши исследования гистаминолиберации из базофилов крови как пациентов с АА, так и здоровых доноров, показали, что в процессе инкубации наибольшее воздействие на базофилы крови оказывают образцы «Этакрил»-ВБ, а наименее выраженное действие оказывают образцы «Фторакс»-СВЧ. Однако у пациентов с atopической аллергией уровень высвобождения гистамина на образцы «Фторакс»-СВЧ более выражен по сравнению со здо-

ровыми лицами. Все исследованные образцы сплавов металлов не приводят к заметному высвобождению гистамина из базофилов крови, и это действие проявляется вне зависимости от тяжести заболевания АА. Из всех исследованных реставрационных стоматологических материалов наибольшее действие на гистаминолиберацию из базофилов крови оказывают образцы реставрационного материала светового отверждения «Филтек». В то же время образцы паст «Цинкоксидэвгенол» и «Сеалит регуляр» не оказывают специфического действия на базофилы крови. Образцы пасты «Форедент» оказывают токсическое действие в отличие от образцов пасты «Эндометазон».

Таким образом, метод определения гистамина высвобождающей активности базофилов крови пациентов может быть использован для индивидуального подбора стоматологических материалов, что позволит избежать развития нежелательных побочных эффектов от их применения у пациентов с АА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайченко О. В. Подверженность акриловой пластмассы «Фторакс» заселению условно патогенными микроорганизмами // Собрание научных работ «Новое в теории и практике стоматологии». – Ставрополь, 2003. – С. 451-453.
2. Babakhin A. A., Nolte H., DuBuske L. M. Effect of misoprostol on the secretion of histamine from

basophils of whole blood // Annals of Allergy, Asthma & Immunol. 2000. №84. P. 361-365.

3. Cox J. C., Coulter A. R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action // Vaccine. 1997. №15. P. 248-255.

4. De Weck A. L. Аллергия и клиническая иммунология в XXI веке. Потенциальные возможности Международной ассоциации по аллергологии и клинической иммунологии (IAACI) и недавно созданной Всемирной организацией по аллергологии (WAO) // Аллергология и иммунология. 2000. №1. P. 5-12.

Поступила 21.06.2010

Координаты для связи с авторами:
dubova.l@gmail.com



**ЛАЗЕРНЫЕ АППАРАТЫ
ДЛЯ СТОМАТОЛОГИИ
"ЛАМИ"**



**НОВЫЕ ПРОСТОРЫ
В СТОМАТОЛОГИИ**

ООО «МедТорг 21»

Москва, Проспект Вернадского, 39

Тел.: (495) 645-91-22, 431-79-18

www.laser.dentarus.ru