

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«06 марта» 2019 г.

Регистрационный номер № 005-0219



**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ПЕРИИМПЛАНТИТА**

(инструкция по применению)

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:** учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

**Авторы:** к.м.н. Карпук Н.А., д.м.н., профессор Рубникович С.П., Афанасьев Д.В., д.м.н., доцент Карпук И.Ю.

Витебск-Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц

06.03.2019

Регистрационный № 005-0219

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ПЕРИИМПЛАНТИТА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ: М. Ю. Карпук, д-р мед. наук, проф. С. П. Рубникович, канд. мед. наук  
Н. А. Карпук, Д. В. Афанасьев, д-р мед. наук, доц. И. Ю. Карпук

Витебск, Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику периимплантита. Он состоит в применении диоксида титана ( $TiO_2$ ), который разводят физиологическим раствором в соотношении 1:1000 для добавления к лейкоцитам крови пациентов с периимплантитом.

Предлагаемый метод диагностики периимплантита с помощью реакции аллергениндуцированного повреждения лейкоцитов (РАПЛ) позволяет достигнуть высокой диагностической эффективности при методической простоте его выполнения и невысокой стоимости.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-стоматологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с симптомами периимплантита.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Центрифуга (1000 об/мин).
2. Камера Горяева.
3. Стеклообразные центрифужные пробирки 10 мл (100 шт.).
4. Термостат.
5. Автоматические дозаторы 20–200 мкл.
6. Микроскоп с иммерсионным увеличением.
7. Предметные стекла (50 шт.).
8. Иммунологические планшеты (10 шт.).
9. Физиологический раствор хлорида натрия.
10. Набор антигенов или аллергенов (по необходимости).
11. Бычий или человеческий сывороточный альбумин.
12. Спирт ректификат 96° (100 мл).
13. Азур-эозин.
14. 0,85 % раствор хлорида аммония.
15. Диоксид титана.
16. Трипановый синий.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Периимплантит.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

В условиях *in vitro* противопоказания отсутствуют. Метод не применяется в случае невозможности получения у пациентов 2 мл крови.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Используют 0,001 % суспензию  $TiO_2$  в физиологическом растворе хлорида натрия.

Для исследования одной концентрации аллергена достаточно 0,5 мл крови, для 10 — 3–5 мл (в зависимости от количества лейкоцитов). Из небольших

количеств крови, взятой из пальца, лейкоциты выделяют путем лизиса эритроцитов 0,85 % раствором хлорида аммония. Для испытания 10 и более антигенов берут из вены 10 мл крови в пробирку, в которую добавлено 20 ед/мл гепарина. Используют суспензию неразделенных лейкоцитов, полученных из плазмы крови после ее отстаивания 30–40 мин. Лейкоциты отмывают от плазмы крови раствором хлорида натрия и готовят их суспензию в концентрации  $2 \times 10^6$  в 1 мл.

Суспензию лейкоцитов (0,25–0,05 мл) смешивают с равным объемом различных концентраций испытуемых аллергенов-растворов солей металлов; к одной пробе (контроль) аллерген не добавляют. Смеси лейкоцитов с аллергенами инкубируют при 37 °С в течение 30 мин. Все пробы дублируют. После инкубации смесь центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость сливают, добавляют 2 капли 0,1 % раствора трипанового синего, ресуспендируют и подсчитывают в камере Горяева процент окрашенных лейкоцитов.

Цитотоксический индекс (ЦИ) равен (формула 1):

$$(a-b): a \times 100 \%, \quad (1)$$

где а — процент окрашенных клеток в опыте после инкубации с аллергеном;  
б — то же, но в опыте без аллергена.

#### *Интерпретация результатов*

Цитотоксические индексы (ЦИ) более 0,15 или присутствие более 14 % поврежденных клеток в опыте по сравнению с контролем указывает на наличие сенсibilизации лейкоцитов к испытуемому аллергену, т. е. на его аллергическую этиологическую роль в данном заболевании.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

1. Использование отрицательного контроля на специфичность при постановке реакции — отрицательная реакция с лейкоцитами доноров или неаллергических пациентов.

2. Контроль положительной реакции. При визуальной оценке результатов реакции с лейкоцитами 2–3 пациентов с известным диагнозом и соответствующим аллергеном — реакция положительная.

## **Обоснование целесообразности практического использования метода**

Проблема периимплантита является актуальной несмотря на успехи дентальной имплантации, и зачастую сопровождается асептическим воспалением. Природа воспаления периимплантат тканей, как и тканей периодонта, активно изучается, но остается не до конца исследованной.

Дентальные имплантаты (ДИ) из сплавов титана обладают хорошей биосовместимостью и высокой устойчивостью к коррозии, но вследствие микродвижения, циклических нагрузок и агрессивной среды рта происходит постоянное разрушение оксидной пленки на поверхности ДИ и высвобождение ионов титана и металлов, которые, соединяясь с белками, оказывают воздействие на систему иммунитета (СИ).

Титан и его сплавы, применяемые для изготовления ДИ, обладают свойством образовывать коррозионно-устойчивую оксидную пленку, состоящую из диоксида титана ( $TiO_2$ ), которая в кислой среде может растворяться.

Покрытие  $TiO_2$  значительно улучшает смачиваемость и прочность адгезии остеобластов к поверхности ДИ, а также образование новой кости по сравнению с поверхностями ДИ, обработанными пескоструйно.

Многочисленные исследования направлены на оптимизацию поверхности ДИ путем изменения их химического состава и/или топографии такими методами, как струйная обработка, плазменное напыление гидроксиапатита, пескоструйная обработка, травление и анодное окисление. Например, для ускорения остеоинтеграции ДИ наночастицы  $TiO_2$  объединяют с полиэфирэфиркетонам для получения биологически активных нанокомпозитов, что инициирует образование новой костной ткани и усиливает прочность связи с ДИ, повышая ее биологическую активность в основном при условии шероховатой композитной поверхности.

$TiO_2$  широко применяется во всем мире, а его уникальная биологическая активность может оказывать негативное влияние на здоровье человека.  $TiO_2$  может воздействовать на слизистую оболочку полости рта (СОПР) в результате высвобождения из ДИ и веществ, содержащих диоксид титана.

Таким образом, становится очевидно, что  $TiO_2$  может влиять на организм системно, поступая энтерально и местно — на СОПР в составе зубопротезных конструкций. Здоровый организм толерантен к  $TiO_2$ , но при нарушении оральной толерантности к нему и ввиду широкой распространенности  $TiO_2$  может оказывать патологические эффекты. Остается не изученной роль клеток врожденного иммунитета у пациентов, в частности, лейкоцитозависимых реакций на  $TiO_2$  *in vitro* при периимплантите. Поэтому оценка гиперчувствительности к  $TiO_2$  у пациентов с периимплантитом является весьма актуальной биомедицинской проблемой.

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач

УЗ «Витебский областной клинический  
стоматологический центр»

\_\_\_\_\_ О. Ю. Богинский

\_\_\_\_\_ 2019

### **Отчет о предварительном клиническом испытании метода диагностики периимплантита**

Для включения пациентов в исследуемую группу нами использована классификация S.A. Jovanovika (1990), согласно которой степень тяжести воспаления разделена на классы: 1 — воспаление мягких тканей — мукозит; 2 — мукозит с легким горизонтальным или вертикальным дефектом кости на 1/5 длины ДИ; 3 — мукозит со среднетяжелым горизонтальным или вертикальным дефектом кости на 1/3 длины ДИ; 4 — мукозит с тяжелым горизонтальным или вертикальным дефектом кости более чем на 1/3 длины ДИ.

Обследованы пациенты с ДИ и периимплантитом и без него.

В группу с ДИ и периимплантитом вошли 23 пациента в возрасте от 31 до 52 лет, из них 10 мужчин и 13 женщин со 2 и 3 классом периимплантита.

Группу с ДИ без периимплантита составили 20 человек (9 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 33 до 59 лет без периимплантита, но сопоставимые по полу, возрасту, числом, срокам пользования ДИ, количеству зубопротезных единиц и типу ортопедических конструкций с пациентами, имеющими периимплантит.

Группу сравнения составили 22 пациента (10 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 35 до 54 лет без ДИ, сопоставимые по полу и возрасту с пациентами исследуемых групп.

Для определения сенсibilизации к  $TiO_2$  нами использована РАПЛ.

*Определение сенсibilизации лейкоцитов с использованием РАПЛ*

В качестве аллергена применялась суспензия  $TiO_2$  — 1 мг порошка на 1 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР), которая не вызывала неспецифического повреждения лейкоцитов в РАПЛ.

Для исследования брали 10 мл крови из вены в пробирку с 20 ед/мл гепарина. Плазму крови отстаивали 30–40 мин и использовали суспензию неразделенных лейкоцитов. Готовили суспензию лейкоцитов в концентрации  $2 \times 10^6$  в 1 мл путем их отмывания от плазмы крови ЗФР.

Суспензию  $TiO_2$  смешивали с 0,25–0,05 мл суспензии лейкоцитов, а к одной пробе, являющейся контрольной,  $TiO_2$  не добавляли. Инкубировали смеси лейкоцитов с суспензией  $TiO_2$  при 37 °С в течение 30 мин. Пробы дублировали. После инкубации смесь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин,

после чего надосадочную жидкость сливали и добавляли 2 капли трипанового синего (0,1 % раствор), ресуспендировали и в камере Горяева подсчитывали процент окрашенных лейкоцитов.

ЦИ рассчитывали по формуле 2:

$$(a-b): a \times 100 \% \quad (2)$$

где *a* — процент окрашенных клеток в опыте после инкубации с аллергеном;  
*b* — то же, но в опыте без аллергена.

Интерпретация результатов осуществлялась следующим образом: если ЦИ был более 15 % (соотношение поврежденных клеток в опыте по сравнению с контролем), то это указывало на наличие сенсibilизации лейкоцитов к раствору-аллергену.

Для статистической обработки результатов исследования использована прикладная программа Statistica 10.0.

В результате исследования установлено, что  $TiO_2$  оказывает иммуномодулирующее влияние на лейкоциты пациентов с периимплантитом, на что указывает прямая сильная корреляция ( $R = 0,76$ ;  $p < 0,05$ ) между результатами выявления гиперчувствительности к  $TiO_2$ , определяемой в РАПЛ и метаболической активности нейтрофилов, определяемой в НСТ-тесте.

В реакции аллергениндуцированного повреждения лейкоцитов выявлена сенсibilизация к  $TiO_2$  у 19 (82,6 %) пациентов с периимплантитом, у 6 (30 %) с дентальным имплантатом без такового и у 2 (9 %) группы сравнения, что указывает на пригодность метода для диагностики периимплантита с учетом высокой диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДЭ) и диагностической эффективности (ДЭ) (таблица).

Полученные данные указывают на взаимосвязь между развитием периимплантита и активацией лейкоцитов под влиянием  $TiO_2$ . Поэтому перед операцией по установке дентальных имплантатов пациентам необходимо пройти тестирование для выявления гиперчувствительности к  $TiO_2$ .

Таблица — Расчет диагностических коэффициентов для растворов солей металлов в группах, обследованных с помощью РАПЛ

Индуктор	ИП	ЛП	ИО	ЛО	ДЧ,%	ДС,%	ДЭ,%
$TiO_2$	19	2	20	3	82,6	91	86,8