

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ЧАСТИЦ НАНОКОМПОЗИТА ДЛЯ ПРЯМЫХ РЕСТАВРАЦИЙ В СТОМАТОЛОГИИ В МОДЕЛЯХ НА КРЫСАХ

Альбина Махмутовна Гималетдинова*, Гульшат Тауфиковна Салеева, Наталья Валентиновна Бойчук, Васыл Алиевич Абдульянов, Ринат Ахмедуллович Салеев

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Поступила 19.07.2017; принята в печать 24.08.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-747

Цель. Изучить цитотоксичность стеклоиономерного цемента 3M™ESPE™Vitremer, нанокompозита для прямых реставраций 3M™ESPE™Filtek™Ultimate и частиц нанокompозита 3M™ESPE™Filtek™Ultimate в эксперименте на лабораторных крысах-самцах линии Wistar.

Методы. У подопытных животных в пришеечной области первого левого верхнего моляра с помощью бора создавали полость, в которую устанавливали пломбы из стеклоиономерного цемента 3M™ESPE™Vitremer, нанокompозита для прямых реставраций 3M™ESPE™Filtek™Ultimate или засыпали порошок нанокompозита 3M™ESPE™Filtek™Ultimate. На 14-е сутки животных выводили из эксперимента и производили забор участка десны, прилегающего к препарированной полости зуба, и участка десны с противоположной стороны зубного ряда. Из забранного материала готовили парафиновые срезы, которые сразу переносили на стёкла. Для гистологического исследования депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и иммуногистохимическим методом с использованием первичных антител к маркёру макрофагов CD68, маркёру пролиферативной активности клеток Ki-67, маркёру клеток тканей внутренней среды виментину, антигену мембраны эндотелиальных клеток CD34 и цитокератину ЦКР-PAN.

Результаты. Получены результаты, подтверждающие цитотоксическое действие частиц нанокompозита 3M™ESPE™Filtek™Ultimate на ткани, окружающие зубы. На оперированной и контралатеральной сторонах выявлены морфологические изменения слизистой оболочки, включая признаки воспаления, гиперкератоза, пролиферативной активности клеток. Изменения слизистой оболочки десны наиболее выражены у животных, в полость зуба которым закладывали порошок из частиц нанокompозита.

Вывод. Учитывая отрицательное влияние частиц нанокompозита, выделяющихся при истирании материала, на слизистую оболочку десны, считаем целесообразным ограничить применение исследуемого материала на окклюзионных поверхностях, подвергающихся большей механической нагрузке, приводящей к интенсивному истиранию.

Ключевые слова: стоматология, нанокompозит, десна, цитотоксичность, эксперимент.

HISTOLOGIC INVESTIGATION OF CYTOTOXICITY OF NANOCOMPOSITE PARTICLES USED FOR DIRECT RESTORATIONS IN DENTISTRY IN RAT MODELS

A.M. Gimaletdinova, G.T. Saleeva, N.V. Boychuk, V.A. Abdul'yanov, R.A. Saleev

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Aim. To study cytotoxicity of glass-ionomer cement 3M™ESPE™Vitremer, nanocomposite for direct restorations 3M™ESPE™Filtek™Ultimate and nanocomposite particles 3M™ESPE™Filtek™Ultimate in the experiment with laboratory male Wistar rats.

Methods. The experimental animals in precervical region of the first left superior molar had a cavity formed with the use of dental drill, which was filled with glass-ionomer cement 3M™ESPE™Vitremer, nanocomposite for direct restorations 3M™ESPE™Filtek™Ultimate or nanocomposite particles 3M™ESPE™Filtek™Ultimate. On day 14 the animals were removed from the experiment, and sample of gingiva adjacent to the formed tooth cavity and sample of gingiva from the opposite side of dental arch were taken. Paraffin sections of the samples were prepared and were straightaway placed on a glass slide. For histologic study deparaffinized sections were stained with hematoxylin and eosin and immunohistochemical test with the use of primary antibodies to macrophage marker CD68, marker of cell proliferative activity Ki-67, mesenchymal marker vimentin, endothelial cell membrane antigen CD34 and cytokeratin CKP-PAN.

Results. The results proving cytotoxic effect of nanocomposite particles 3M™ESPE™Filtek™Ultimate on the tissues surrounding teeth, were received. On the operated and contralateral sides morphologic changes of mucosa were found including the signs of inflammation, hyperkeratosis, and cell proliferative activity. Changes of gingival mucosa are mostly pronounced in animals whose tooth cavity was filled with nanocomposite particles.

Conclusion. Taking into account the negative effect of nanocomposite particles discharging at erosion on gingival mucosa, we consider it reasonable to limit the use of the studied materials on occlusal surfaces exposed to heavy mechanical load leading to intensive erosion.

Keywords: dentistry, nanocomposite, gingiva, cytotoxicity, experiment.

Нанотехнологии всё шире применяют во многих сферах промышленности, в том числе и медицинской. Не стала исключением и индустрия стоматологических матери-

алов, где наночастицы используют, например, в качестве наполнителя композитных материалов. Сочетание высоких эстетических и прочностных характеристик этих материалов стало возможным благодаря уникальным физико-химическим свой-

ствам наночастиц кремния по сравнению с микроразмерными частицами. Однако, обладая определёнными физическими, химическими и биологическими свойствами, наночастицы могут оказывать биологические эффекты на клетки, ткани и организм в целом, отличающиеся от действий микроразмерных частиц [1, 2].

Учитывая, что любой композитный материал при длительной эксплуатации подвергается механическому истиранию с выделением мелких частиц материала, в том числе и наночастиц, возникают сомнения в целесообразности применения нанокompозитов при тотальных реставрациях зубных рядов, так как в этих случаях увеличивается количество выделяемых наночастиц и возможно их накопление в окружающих тканях. По этой причине, несмотря на то обстоятельство, что все реставрационные материалы, применяемые в клинике, сертифицированы и рекомендованы для пломбирования зубных полостей всех классов при объёмных реставрациях у одного пациента, необходимы дополнительные фундаментальные исследования и доказательства биосовместимости и биобезопасности используемых нанокompозитных материалов.

В наших предыдущих исследованиях была изучена цитотоксичность частиц нанокompозита 3M™ESPE™Filtek™Ultimate в культуре клеток линии карциномы лёгкого человека (A549) и установлена линейная зависимость действия частиц нанокompозита на выживаемость и функциональную активность клеток [3]. В настоящей работе проведено сравнительное исследование цитотоксичности стеклоиономерного цемента 3M™ESPE™Vitremer, нанокompозита для прямых реставраций 3M™ESPE™Filtek™Ultimate и частиц нанокompозита 3M™ESPE™Filtek™Ultimate в моделях на крысах.

Эксперименты выполнены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar с массой тела 300–350 г. Животные были получены из центрального вивария Казанского государственного медицинского университета (КГМУ). Лабораторные животные содержались в отдельных клетках со свободным доступом к воде и пище. Уход за животным соответствовал международным правилам и нормам. Экспериментальная работа одобрена локальным этическим комитетом КГМУ.

Операции на животных.

Препарирование и пломбирование полости зуба крыс осуществляли под анесте-

зией путём внутривентрального введения растворов золетила 100 (Virbac Sante Animale, Франция) 15 мг/кг и препарата ксила (Interchemiewerken «DeAdelaar B.V», Нидерланды) 0,2 мл/кг. Всем животным производили препарирование полости в пришеечной области первого левого верхнего моляра на буккальной поверхности. Для ретракции мягких тканей щёк использовали микрохирургический ранорасширитель. Препарирование зуба осуществляли при помощи алмазного шаровидного бора диаметром 1 мм прямым наконечником. Пульпу зуба не вскрывали.

После создания полости животных делили на три группы:

– первая группа — с пломбой из стеклоиономерного цемента 3M™ESPE™Vitremer (n=3);

– вторая группа — с пломбой из нанокompозитного пломбировочного материала 3M™ESPE™Filtek™Ultimate (n=3);

– третья группа — с закладкой в препарированную полость зуба порошка нанокompозитного пломбировочного материала 3M™ESPE™Filtek™Ultimate (n=3).

При пломбировании полости зуба для изоляции рабочего поля от слюны по переходной складке и в области дна рта помещали ватные валики.

У первой группы животных перед установкой пломбы из стеклоиономерного цемента 3M™ESPE™Vitremer полость предварительно подготавливали следующим образом: с помощью кисточки на всю поверхность полости наносили праймер в течение 30 с, высушивали с помощью воздуха из шприца в течение 15 с и засвечивали в течение 20 с. Замешивание порошка и жидкости осуществляли согласно инструкции в весовом соотношении 2,5/1 в течение 45 с. Полученным пломбировочным материалом с помощью гладилки закрывали полость зуба. Ватные валики удаляли после полной полимеризации цемента через 40 с.

У второй группы животных перед установкой нанокompозитной пломбы ткани зуба предварительно протравливали 37% ортофосфорной кислотой в течение 15 с. Кислоту смывали дистиллированной водой из шприца, полость высушивали с помощью воздуха из шприца. Затем в полость зуба брашем вносили адгезив и засвечивали полимеризационной лампой в течение 20 с. Нанокompозит вносили в полость одной порцией и засвечивали в течение 20 с.

В третьей экспериментальной груп-

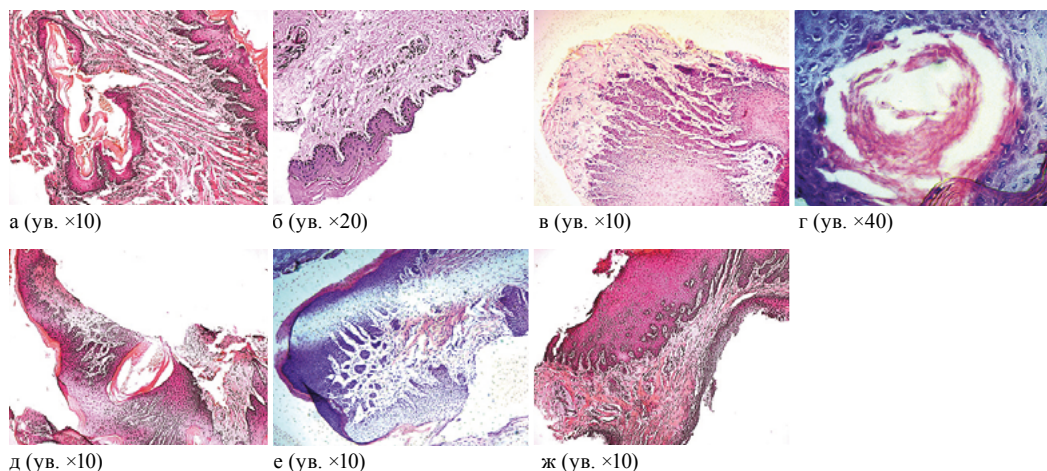


Рис. 1. Слизистая оболочка десны лабораторных крыс. Окраска гематоксилином и эозином: а — оперированная сторона первой группы; б — контралатеральная сторона первой группы; в, г — оперированная сторона второй группы; д — контралатеральная сторона второй группы; е — оперированная сторона третьей группы; ж — контралатеральная сторона третьей группы; ув. — увеличение

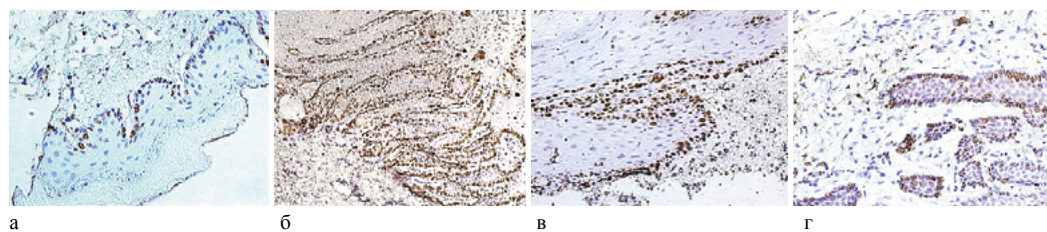


Рис. 2. Иммуногистохимические исследования слизистой оболочки десны лабораторных крыс. Изучение экспрессии маркёров Ki-67, CD34 и CD68: а — контралатеральная сторона; б — первая группа; в — вторая группа; г — третья группа; увеличение $\times 20$

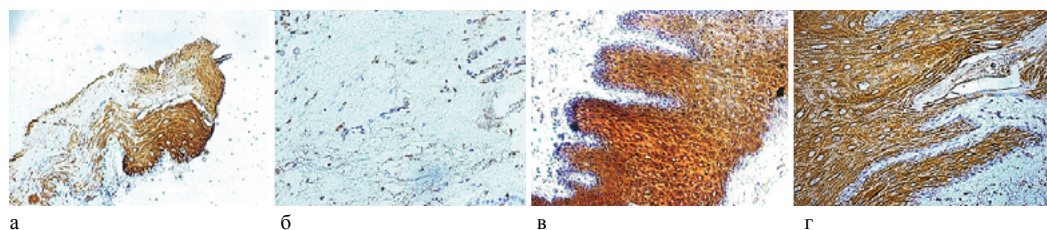


Рис. 3. Иммуногистохимические исследования слизистой оболочки десны лабораторных крыс. Изучение экспрессии ЦКР-PAN и виментина: а — реакция на маркёр ЦКР-PAN на контралатеральной стороне; б — реакции на виментин на контралатеральной стороне; в — первая группа; г — третья группа; увеличение $\times 20$

пе крыс порошок нанокompозита 3M™ESPE™Filtek™Ultimate помещали в полость зуба ежедневно в течение 14 дней.

На 14-е сутки под глубоким наркозом с помощью золетила 100 (Virbac Sante Animale, Франция; 15 мг/кг) и препарата ксила (Interchemiewerken «DeAdelaag B.V», Нидерланды; 0,2 мл/кг) животных выводили из эксперимента и производили забор участка десны, прилегающего к препарированной полости зуба, и участка десны с противоположной стороны зубного ряда.

Забранный материал фиксировали в 10% растворе формалина и заливали в па-

рафин. На микротоме Leica RM2245 получали парафиновые срезы толщиной 6 мкм, которые сразу переносили на стёкла. Для гистологического исследования депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и иммуногистохимическим методом по общепринятому протоколу с использованием первичных антител к маркёру макрофагов CD68 (1:300, ab955, Abcam Plc, Великобритания), маркёру пролиферативной активности клеток Ki-67 (1:500, ab15580, Abcam Plc, Великобритания), маркёру клеток тканей внутренней среды виментину (1:500, ab92547,

Abscam Plc, Великобритания), антигену мембраны эндотелиальных клеток CD34 (1:300, sc-7045, Santa Cruz Biotechnology Inc, США), цитокератину ЦКР-PAN (1:300, ab215838, Abscam Plc, Великобритания). Инкубацию с поликлональными первичными антителами проводили в течение 12 ч при температуре +4 °С.

Для иммунной реакции с первичными антителами был применён стрептавидин-биотиновый комплекс Elite ABC Kit (PK-6200, Invitrogen, США). Иммунопреципитат визуализировали при помощи диаминбензидина (DAB Substrate Kit for Peroxidase; SK-4100, Vector Laboratories, США). После окрашивания срезы высушивали и заключали в среду ImmuMount (Thermo Scientific, США). Изображения микропрепаратов получали на микроскопе Axio Lab.A1 (Carl ZEISS, Германия) с помощью камеры AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия) и программы AxioVision LE (Carl Zeiss, Германия).

Морфологический анализ.

У крыс первой группы на оперированной стороне выявлены незначительные изменения структуры слизистой оболочки десны. Ороговение эпителия представляется более выраженным, особенно в области краевой десны, в эпителии отмечены клетки зернистого слоя. Эпителий проявляет признаки гиперкератоза (рис. 1, а). Степень гиперкератоза у разных животных первой группы варьирует от слабого до довольно выраженного. Выявлен клеточный полиморфизм. Соединительная ткань собственного слоя в целом представляется неизменной, встречаются участки уплотнения собственного слоя слизистой оболочки. В глубоких слоях соединительной ткани обнаружены кистозные образования, выстланные многослойным ороговевающим эпителием (см. рис. 1, а). На контралатеральной стороне альвеолярная слизистая оболочка и десна имеют типичное строение. В области прикрепленной десны присутствует умеренно ороговевающий многослойный плоский эпителий (рис. 1, б). Подлежащая соединительная ткань собственного слоя образует высокие сосочки, вдающиеся в эпителий.

Во второй группе животных обнаружены существенные изменения строения слизистой оболочки десны. Ороговение эпителия усилено (гиперкератоз). Отмечено разрастание эпителиальных гребней, вдающихся в соединительную ткань, что произошло за счёт активной пролифера-

ции базальных кератиноцитов, а также разрастание соединительнотканых сосочков (рис. 1, в). В эпителии присутствуют кисты, выстланные кератинизированной тканью (рис. 1, г). Кисты обнаружены как в поверхностных, так и в базальных слоях эпителиального пласта. В собственном слое слизистой оболочки выявлены признаки выраженного хронического воспаления: лимфоцитарные инфильтраты, уплотнения соединительной ткани в виде многочисленных пучков коллагеновых волокон. Строеение слизистой оболочки также изменено и на контралатеральной стороне. Ороговение эпителия более выражено, чем в первой группе. На отдельных участках — утолщение эпителия и формирование полых образований овальной формы, выстланных слоями кератинизированной ткани — ороговевающие кисты (рис. 1, д). В собственном слое слизистой оболочки встречаются лимфоидные инфильтраты и уплотнённые пучки коллагеновых волокон, что свидетельствует о развитии хронического воспалительного процесса.

У животных третьей группы строение слизистой оболочки десны нарушено. Отмечена пролиферация кератиноцитов базального слоя эпителия, за счёт чего произошло разрастание эпителиально-сосочковых образований, вдающихся в собственный слой слизистой оболочки десны, и, соответственно, увеличение высоты фиброзных сосочков (рис. 1, е). На контралатеральной стороне выражены признаки хронического воспаления (рис. 1, ж). В собственном слое слизистой оболочки присутствуют многочисленные инфильтраты, видно разрастание плотных пучков коллагеновых волокон.

Иммуногистохимическое исследование.

У животных первой группы на оперированной стороне при сравнении с контралатеральной обнаружено усиление экспрессии Ki-67 в клетках соединительной ткани (вблизи кровеносных сосудов) и кератиноцитах базального слоя эпителия. Положительной окраски на CD34 и CD68 как на оперированной, так и на противоположной не выявлено (рис. 2, а, б). Реакция на ЦКР-PAN дала резко положительную окраску кератиноцитов всего эпителиального пласта. Количество виментин-положительных клеток также не отличается на обеих сторонах (рис. 3, а–в).

В слизистой оболочке десны на оперированной стороне животных второй группы выявлено усиление экспрессии Ki-67, как в

базальном слое эпителия, так и в структурах собственного слоя подлежащей соединительной ткани. Реакция на CD34 и CD68 отсутствует (рис. 2, в). Результаты иммуногистохимического окрашивания на ЦКР-PAN оказались неоднозначными. В одних случаях окраска на ЦКР-PAN выявила немногочисленные ЦКР-PAN-положительные кератиноциты в базальном слое эпителия. В других случаях экспрессия ЦКР-PAN эпителиальными клетками была резко выраженной. Экспрессия виментина обнаружена в отдельных клетках собственного слоя слизистой оболочки.

В слизистой оболочке десны на оперированной стороне третьей группы животных зарегистрирована высокая активность Ki-67 в кератиноцитах базальных слоёв эпителия. В подлежащей соединительной ткани также присутствуют экспрессирующие Ki-67 клетки. Положительной окраски на CD34 и CD68 не выявлено (рис. 2, г). При окрашивании на ЦКР-PAN зафиксировано увеличение количества позитивных кератиноцитов базального слоя. Выявлены сопочковые разрастания, в которых обнаружены ЦКР-PAN-положительные клетки. Отдельные клетки собственного слоя слизистой оболочки экспрессируют виментин (см. рис. 3, б).

Создание нанокompозитных материалов для прямых реставраций зубов — одно из последних достижений современной стоматологии. Они имеют свою особенность: в качестве наполнителя используют частицы кремниевого наполнителя размером 20 нм и циркониевого наполнителя размером 4–11 нм, объединённые в кластеры, что позволяет добиться высокой прочности, как у макронаполненных, и эстетики, как у микронаполненных композитов. Хорошая полируемость и длительное сохранение блеска этих материалов обусловлены тем, что при его истирании отделяются мелкие частицы материала (в том числе и наночастицы), не изменяя качество поверхности реставрационного материала.

В современной литературе всё чаще встречается информация относительно токсичности оксида кремния [1, 2]. Известны многочисленные исследования, доказывающие цитотоксическое действие наночастиц оксида кремния при их ингаляции на производстве [4, 5]. Помимо дыхательных путей, наночастицы могут попадать в организм и через желудочно-кишечный тракт [6, 7].

K. Gerloff и соавт. [8] исследовали ци-

тотоксическое действие наночастиц оксида кремния на эпителиальные клетки ободочной кишки человека *in vitro*. Гепатоциты человека также вступают в апоптоз после воздействия частиц аморфного кремнезёма в наноразмерном диапазоне [9]. С. Guo и соавт. [10] доказали способность наночастиц кремнезёма вызывать повреждения сосудистого эндотелия. P. Merget и соавт. [11] обобщили результаты исследований о воздействии на лёгкие работников предприятий пыли кристаллического кремнезёма.

Таким образом, оксид кремния может обладать цитотоксичностью в зависимости от размера, дозы и времени воздействия. В этой связи использование нанокompозитных материалов требует фундаментальных исследований и доказательства их биобезопасности.

Ранее *in vitro* нами была изучена цитотоксичность частиц нанокompозита 3M™ESPE™Filtek™Ultimate в диапазоне концентраций от 10 до 0,009 мг/мл. Установлено, что концентрация препарата IC50, ингибирующая на 50% клеточные функции, составляет 1,25 мг/мл. Пограничной концентрацией цитотоксичности следует считать 0,313 мг/мл, а в концентрациях 0,156 мг/мл и ниже исследуемое вещество не оказывает токсического эффекта на клетки A549 [3]. В данном *in vivo* исследовании мы получили результаты, подтверждающие цитотоксическое действие частиц нанокompозита 3M™ESPE™Filtek™Ultimate на ткани, окружающие зубы.

При оценке результатов морфологического исследования следует отметить, что наименьшие изменения выявлены у животных с пломбой из стеклоиономерного цемента 3M™ESPE™Vitremet. У подопытных крыс второй и третьей групп отмечены существенные изменения строения слизистой оболочки десны. Для животных с пломбами из материала 3M™ESPE™Filtek™Ultimate, как и тех, которым в полость зуба закладывали порошок нанокompозита, характерны признаки гиперкератоза и хронического воспаления и, кроме этого, наличие кист как в поверхностных, так и в базальных слоях эпителиального пласта.

Однако следует заметить, что подобные изменения отмечены и на контралатеральной стороне у этих же животных, что свидетельствует о возможном воздействии на организм пациента в целом наночастиц, выделяющихся при истирании пломбы во время жевания.

Во всех трёх группах обнаружено уси-

ление экспрессии Ki-67, но у животных, которым в полость зуба закладывали порошок нанокompозита, выявлена самая высокая его активность, что свидетельствует о повышении уровня пролиферативных процессов в ткани [12].

Положительной окраски на CD34 и CD68 не зарегистрировано ни в одной из групп. Реакция на маркер ЦКР-PAN дала резко положительную окраску кератиноцитов всего эпителиального пласта в первой группе, в некоторых случаях — во второй группе, увеличение количества позитивных кератиноцитов базального слоя в третьей группе. Экспрессия виментина во всех трёх группах, так же как и на противоположной стороне, выявлена в отдельных клетках.

ВЫВОД

Универсальный реставрационный материал 3M™ESPE™Filtek™Ultimate в соответствии с инструкцией рекомендован для применения при пломбировании передних и задних групп зубов (включая окклюзионные поверхности), для надстройки культы, шинирования и не прямых реставраций, в том числе вкладок, накладок и виниров. Однако, учитывая возможное отрицательное влияние частиц нанокompозита, выделяющихся при истирании материала, на ткани организма, считаем целесообразным ограничить применение материала на окклюзионных поверхностях, так как в этой области реставрации они подвергаются большей механической нагрузке и истираются быстрее.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

Авторы благодарны Е.Н. Александровой (КГМУ) и М.Е. Соколову (КГМУ) за помощь в проведении исследования.

Авторы признательны проф. Р.Р. Исламову (КГМУ) за помощь в подготовке манускрипта.

1. Napierska D., Thomassen L.C., Lison D. et al. The nanosilica hazard: another variable entity. *Part Fibre Toxicol.* 2010; 7 (1): 39. DOI: 10.1186/1743-8977-7-39.
2. Fruijtier-Pölloth C. The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica-a nanostructured material. *Toxicology.* 2012; 294 (2–3): 61–79. DOI: 10.1016/j.tox.2012.02.001.
3. Салеева Г.Т., Гималетдинова А.М., Тарасова Е.Ю. и др. Исследование цитотоксичности *in vitro* частиц нанокompозита для прямой реставрации зубов в стоматологии. *Гены & Клетки.* 2015; 10 (4): 63–67. [Saleeva G.T., Gimaltdinova A.M., Tarasova E.Yu. et al. Nanocomposite material for stomatology restovration particles cytotoxicity: an *in vitro* study. *Geny & Kletki.* 2015; 10 (4): 63–67. (In Russ.)]
4. Maser E., Schulz M., Sauer U.G. et al. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity investigations of differently sized amorphous SiO₂ nanomaterials. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2015; 794: 57–74. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.10.005.
5. Guichard Y., Fontana C., Chavinier E. et al. Cytotoxic and genotoxic evaluation of different synthetic amorphous silica nanomaterials in the V79 cell line. *Toxicol. Ind. Health.* 2016; 32 (9): 1639–1650. DOI: 10.1177/0748233715572562.
6. Van der Zande M., Vandebriel R.J., Groot M.J. et al. Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica. *Part Fibre Toxicol.* 2014; 11: 8. DOI: 10.1186/1743-8977-11-8.
7. Winkler H.C., Suter M., Naegeli H. Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food. *J. Nanobiotechnology.* 2016; 14 (1): 44. DOI: 10.1186/s12951-016-0189-6.
8. Gerloff K., Albrecht C., Boots A.W. et al. Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology.* 2009; 3: 355–364. DOI: 10.3109/17435390903276933.
9. Ye Y., Liu J., Xu J. et al. Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line. *Toxicol. In Vitro.* 2010; 24: 751–758. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.01.001.
10. Guo C., Yang M., Jing L. et al. Amorphous silica nanoparticles trigger vascular endothelial cell injury through apoptosis and autophagy via reactive oxygen species-mediated MAPK/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Int. J. Nanomed.* 2016; 11: 5257–5276. DOI: 10.2147/IJN.S112030.
11. Merget R., Bauer T., Küpper H.U. et al. Health hazards due to the inhalation of amorphous silica. *Arch. Toxicol.* 2002; 75 (11–12): 625–634. DOI: 10.1007/s002040100266.
12. Островская Л.Ю., Бейбулатов Г.Д., Ханина А.И. и др. Современные иммуноморфологические аспекты диагностики заболеваний пародонта. *Саратовский науч.-мед. ж.* 2013; 9 (3): 453–456. [Ostrovskaya L.Yu., Beybulatov G.D., Khanina A.I. et al. Morden immunomorphological aspects of diagnostics of periodontal diseases. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal.* 2013; 9 (3): 453–456. (In Russ.)]