

В. А. Румянцев¹, Ш. Л. Шиманский³, В. Г. Шестакова², С. А. Донсков², А. В. Блинова¹,
Д. Д. Теремов¹, Р. С. Оганесян¹

¹ Кафедра пародонтологии

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России,

² Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России,

³ ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет

им. А. И. Евдокимова Минздрава России

НОВАЯ МЕТОДИКА КЛИНИЧЕСКОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МАКРОФАГОВ: МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА

Проведено гистоморфологическое и морфометрическое изучение срезов тканей десны 20 добровольцев в возрасте от 35 до 44 лет — больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести — в начале и спустя месяц консервативной подготовки к хирургическому лечению. В основной группе в течение 1 месяца реализовывали новый метод клинического репрограммирования макрофагов *in vivo*. Выявили высокую эффективность этой методики, позволяющей репрограммировать провоспалительный фенотип М1 макрофагов тканей пародонта в противовоспалительный фенотип М2. Новая методика может быть эффективна в дополнение к традиционному комплексному лечению воспалительных заболеваний пародонта.

Ключевые слова: пародонтит, репрограммирование макрофагов, гистоморфология.

V. A. Romyantsev¹, Sh. L. Shymansky², V. G. Shestakova¹, S. A. Donskov¹, A. V. Blinova¹,
D. D. Teremov¹, R. C. Oganesyanyan¹

¹ Tver State Medical University,

² Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A. I. Evdokimov

A NEW METHOD OF CLINICAL REPROGRAMMING OF MACROPHAGES: MORPHOLOGICAL CHANGES IN PERIODONTAL TISSUES

A histomorphological and morphometric study of gingival tissue sections of 20 volunteers aged 35 to 44 years, patients with chronic generalized periodontitis of moderate severity, was carried out at the beginning and after a month of conservative preparation for surgical treatment. In the main group, a new method of clinical reprogramming of macrophages *in vivo* was implemented for 1 month. The high efficiency of this technique was revealed, which allows reprogramming the pro-inflammatory phenotype M1 of macrophages of periodontal tissues into the anti-inflammatory phenotype M2. The new technique may be effective in addition to the traditional complex treatment of inflammatory periodontal diseases.

Key words: periodontitis, macrophage reprogramming, histomorphology.

Введение

При воспалении в тканях пародонта развивается неадекватная извращенная иммунологическая реакция, обусловленная выраженной васкуляризацией десны. Эта особенность гингивита и пародонтита приводит к хронизации процесса или, наоборот, к его бурному течению. С клеточным компонентом непосредственно связана первая линия защиты, реализуемая, в частности, нейтрофилами и макрофагами в участках воспаления.

Макрофаги образуются из моноцитов периферической крови и представляют собой довольно крупные клетки, которые, в отличие от округлых и более мелких моноцитов, морфологически полиморфны и имеют неправильную полигональную форму [1]. Механизм активации макрофагов достаточно хорошо изучен при

такой частой общей хронической патологии, как атеросклероз кровеносных сосудов и обструктивная болезнь легких [2–3]. Известна способность макрофагов, исходя из характеристик окружающей среды, проявлять про- или противовоспалительную активность [4–5]. Выделяют два основных полярных типа активированных макрофагов: М1 и М2 [6]. Фенотип М1 способствует увеличению секреции провоспалительных цитокинов [7]. Такие макрофаги, проявляя цитотоксическую и бактерицидную активность, инициируют воспаление. А под влиянием иммунных комплексов и интерлейкинов IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-13, а также грибковой и гельминтной инфекции, происходит альтернативная активация макрофагов в фенотип М2 [8–10]. Известны биотехнологии культивирования активных макрофагов, их репрограммирования *in vitro* [11–12].

Основываясь на ранее проведенных экспериментальных исследованиях, мы предположили, что репрограммирование макрофагов возможно непосредственно в тканях организма *in vivo*. Принимая во внимание извращенность иммунологических реакций в тканях пародонта, мы разработали клиническую технологию репрограммирования макрофагов из провоспалительного фенотипа М1 в противовоспалительный фенотип М2, исключаящую необходимость использования длительно реализуемых биотехнологий *in vitro* [13]. Суть технологии состоит в получении аутологичной обедненной клеточными элементами сыворотки венозной крови с большим количеством факторов репрограммирования макрофагов и дальнейшем ее инъекционном введении в ткани пародонта. Для получения сыворотки забирают венозную кровь у больного в количестве до 10 мл и проводят двойное центрифугирование с «мягким стартом» при 10 000 об/мин и сразу же вводят подслизисто в области переходной складки в зонах воспаления тканей пародонта. Под влиянием такой аутосыворотки изменяется среда обитания макрофагов в ткани и происходит постепенное репрограммирование макрофагов в фенотип М2.

Целью исследования явилась оценка морфологических изменений в тканях пародонта под влиянием новой клинической методики репрограммирования макрофагов.

Материал и методы исследования

Для достижения цели осуществили экспериментальное клинико-морфологическое исследование с участием 20 добровольцев (в возрасте от 35 до 44 лет, средняя возрастная группа ВОЗ) — больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести (код по МКБ: K05.31). После традиционного пародонтологического обследования и постановки диагноза больным проводили комплексное пародонтологическое лечение. Но период наблюдения за больными длился только месяц, в течение которого у них осуществляли подготовку к последующему хирургическому лечению, направленному на устранение патологических пародонтальных карманов. Такая подготовка включала коррекцию индивидуальной гигиены полости рта и профессиональную гигиену, при необходимости избирательное шлифовывание зубов и их временное шинирование, а также местное консервативное лечение в соответствии с клиническими рекомендациями, утвержденными Стomatологической ассоциацией России (СтАР) 30.09.2014 г. Произвольно больных разделили на две группы: основную и группу сравнения (по 4 мужчин и 6 женщин в каждой). У больных группы сравнения проводили только традиционное лечение. А у пациентов основной группы дополнительно к нему еще реализовывали метод клинического репрограммирования макрофагов *in vivo*. Каждый доброволец давал письменное информированное согласие. Исследование одобрено Этическим комитетом Тверского ГМУ 25.04.2016 г.

Перед началом лечения и в конце периода наблюдения за больными (через месяц) проводили биопсийное морфологическое исследование тканей десны. Иссекали мелкие фрагменты многослойного плоского

ороговевающего эпителия десны с подлежащими тканями в тех участках, где это не могло принести ощутимого ущерба для больного. Биопсийный материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина (рН=7,2), затем проводили в изопропиловом спирте с добавлением «IsoPrep» (ООО «ЭргоПродакшн», Россия) и заливали в гомогенизованную парафиновую среду «HISTOMIX» (ООО «ЭргоПродакшн», Россия), формируя блоки. Из парафиновых блоков изготавливали гистологические препараты толщиной 5–6 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Также применяли гистохимическую окраску по Вейгерту — Ван-Гизону.

Морфологический материал разделили на три группы: от всех больных до начала лечения (А), через месяц от его начала от больных группы сравнения (В) и основной группы (С). При микроскопировании препаратов оценивали динамику воспалительной реакции и характер регенерации тканей. Микроскопическое и морфометрические исследования, фоторегистрацию проводили с применением: исследовательского тринокулярного микроскопа «Nikon Eclipse 50i» (Nikon, Япония), специализированной цифровой фотокамеры «Nikon DS-Fi2» (Nikon, Япония) и персонального компьютера с использованием специализированных морфометрических программ «NIS-Elements» (Nikon Instruments Inc., США) и «BioVision Professional» (BioVision Inc., США).

При морфометрическом исследовании материала определяли: плотность воспалительного инфильтрата (путем подсчета количества клеток в 10 полях зрения в препаратах при увеличении $\times 400$); состав клеточного инфильтрата с подсчетом нейтрофильных лейкоцитов, лимфоцитов, фибробластов, фиброцитов, плазматических клеток и макрофагов (в %) — в 10 полях зрения с каждого микропрепарата при увеличении $\times 400$. Кроме того, определяли процентное соотношение макрофагов фенотипов М1 и М2. Отличительными морфологическими признаками этих фенотипов макрофагов являются округлая форма — для фенотипа М1 и фибробластоподобная — для фенотипа М2. Морфологический индекс М1/М2 в норме для тканей пародонта — от 0,09 до 1,13. Статистический анализ цифровых показателей, имеющих нормальное распределение, проводили с помощью критерия *t*. Проверку на нормальность распределения оценивали при помощи критерия Шапиро — Уилка. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Морфологическая характеристика гистопрепаратов десны, полученных от обеих групп больных, до лечения не отличалась. В многослойном плоском ороговевающем эпителии выявлялись акантоз и паракератоз. Имелись эрозивные дефекты с тканевым детритом на поверхности. В подлежащей соединительнотканной строме имелась выраженная воспалительная инфильтрация, отек, полнокровные сосуды и очаговые кровоизлияния (рис. 1А). Морфометрические исследования показали, что плотность клеточного инфильтрата составляла $483 \pm 12,4$ клеток в поле зрения (рис. 1Б), и он

на $34,7 \pm 1,6$ % состоял из нейтрофильных лейкоцитов, на $37,1 \pm 1,2$ % — из лимфоцитов, на $10,7 \pm 0,8$ % был представлен плазматическими клетками, на $6,1 \pm 0,3$ % — фибробластами. Макрофагов было обнаружено $11,4 \pm 0,4$ %. При этом значительно преобладали макрофаги фенотипа M1 (74,4 %) в сравнении с фенотипом M2 (25,6 %, рис. 1В).

При оценке гистопрепаратов, полученных через месяц от начала лечения, в группе сравнения в строме под эпителием выявляли полнокровные сосуды (рис. 2А), а также гиперкератоз эпителия (рис. 2Б) и липоматоз в подлежащей строме (рис. 2В). Среди коллагеновых волокон было обнаружено значительное количество сосудов, что является признаком неполного созревания соединительной ткани (рис. 2Г, Д).

Морфометрические исследования показали плотность клеточного инфильтрата — $127 \pm 3,2$ клеток в поле зрения, а изменения его состава по сравнению с первичным исследованием заключалось в уменьшении числа нейтрофильных лейкоцитов (на 13,2 %), лимфоцитов (на 10,5 %), плазматических клеток (на 8,4 %), макрофагов (на 5,8 %). Число фибробластов, напротив, увеличилось на 9,5 % и появились фиброциты — $44,2 \pm 1,5$ %. Соотношение макрофагов M1/M2 фенотипов составило 36,2 % к 63,8 % соответственно. Таким образом, в группе сравнения без применения новой методики через месяц от начала традиционного лечения наблюдали стихание воспалительной реакции и формирование соединительнотканного матрикса в строме с преобладанием M2 (ремоделирующего)

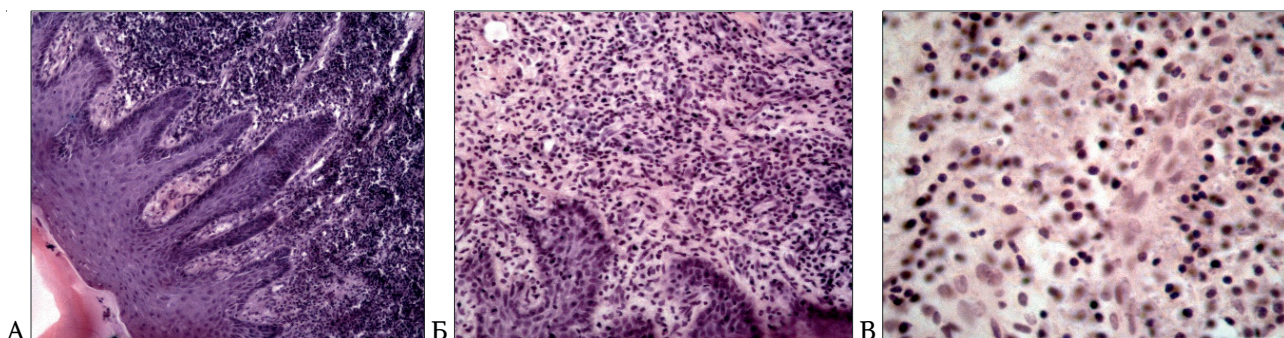


Рис. 1. Морфологические изменения в начале исследования. Акантоз и паракаротоз в многослойном плоском ороговевающем эпителии. Выраженная воспалительная инфильтрация стромы, отек, полнокровные сосуды (А, Б). Преобладание макрофагов фенотипа M1 в воспалительном инфильтрате (В). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: А $\times 150$; Б $\times 200$; В $\times 400$

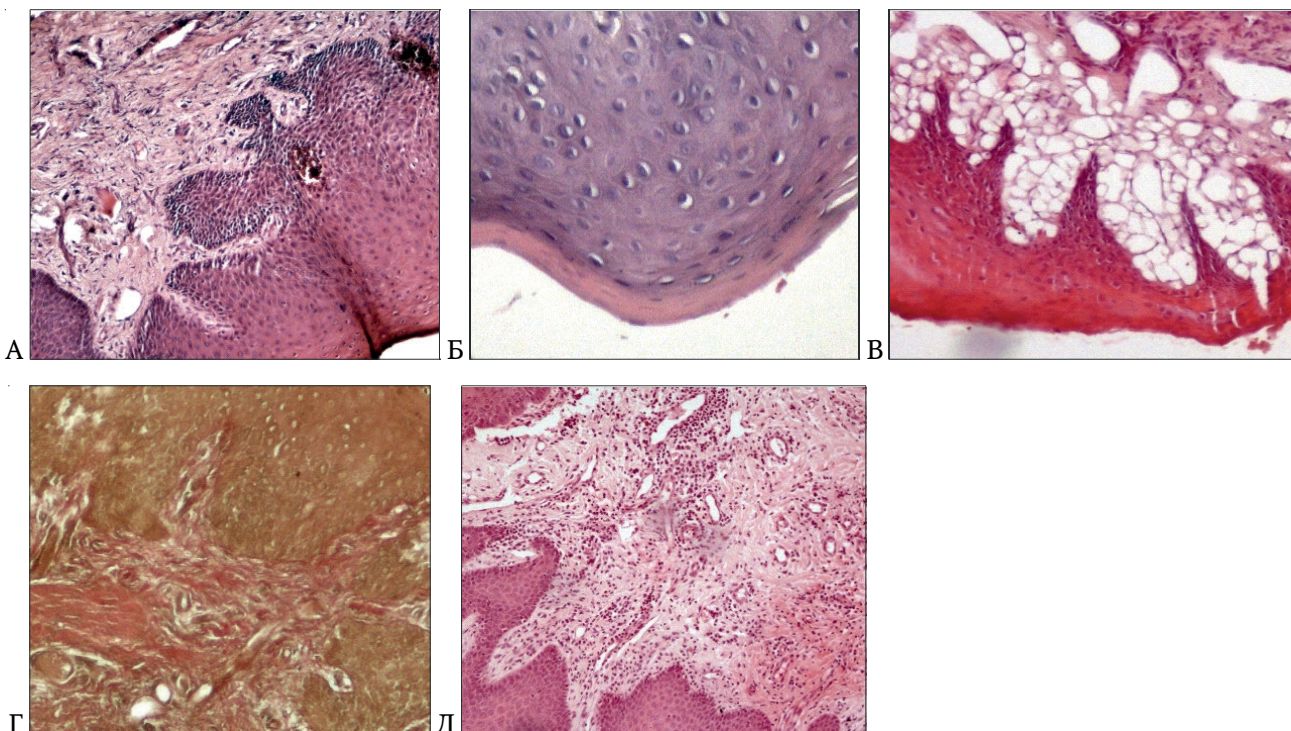


Рис. 2. Морфологические изменения в конце исследования без репрограммирования макрофагов. Акантоз (А) и гиперкератоз (Б) многослойного ороговевающего эпителия, полнокровные сосуды в строме (А). Липоматоз и расширенные сосуды под эпителием (В). Большое количество сосудов в соединительной ткани (неполное созревание, Г), грануляционная ткань с обилием сосудов (Д). Окраска гематоксилином и эозином (А, Б, В, Д), по Вейгерт — Ван-Гизону (Г). Ув.: А, В, Г, Д $\times 100$; Б $\times 200$

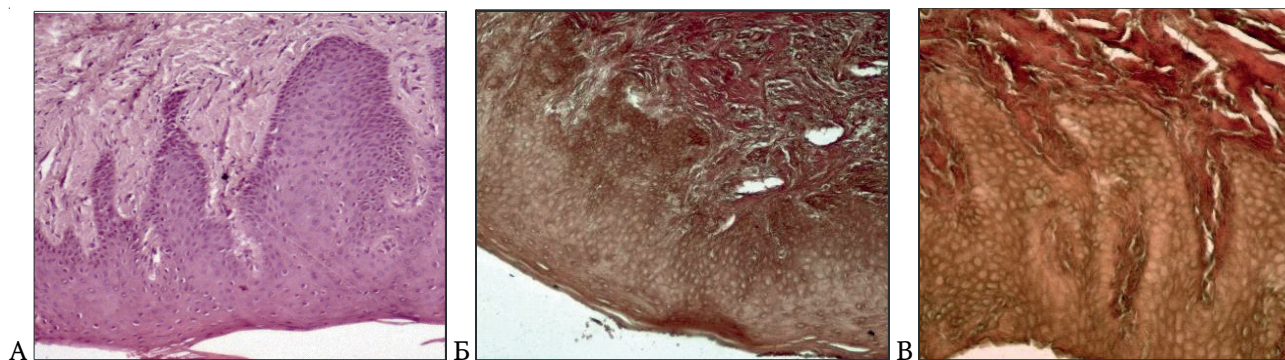


Рис. 3. Морфологические изменения в конце исследования после клинического репрограммирования макрофагов. Отсутствие воспалительной реакции в строме (А). Зрелая соединительная ткань в строме (Б, В). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

фенотипа макрофагов. В то же время отмечены морфологические признаки неполного созревания соединительной ткани.

В основной группе пациентов через месяц от начала лечения патологических изменений в эпителии не было выявлено. В подлежащей строме не наблюдали воспалительной инфильтрации (рис. 3А). При окраске по Вейгерт – Ван-Гизону обнаруживали зрелые коллагеновые волокна и фиброциты (рис. 3Б, В).

Морфометрические исследования показали отсутствие воспалительной инфильтрации. Плотность клеточного инфильтрата в соединительнотканном матриксе стромы составила в среднем $85 \pm 2,7$ клеток в поле зрения. В составе инфильтрата в сравнении с первичным исследованием уменьшилось число нейтрофильных лейкоцитов (на 31,0 %), лимфоцитов (на 11,2 %), плазматических клеток (на 6,2 %), макрофагов (на 4,8 %). Число фибробластов увеличилось на 6,8 %, а число фиброцитов достигло $49,4 \pm 1,9$ %. Значительно преобладали макрофаги фенотипа М2 (82,3 %) против 17,7 % фенотипа М1. Таким образом, в биоптатах основной группы больных гистологическая картина характеризовалась отсутствием изменений со стороны эпителия и воспалительной реакции, полным созреванием соединительной ткани с формированием полноценного соединительнотканного матрикса в подлежащей строме и значительным преобладанием М2 фенотипа макрофагов.

Проведенное контролируемое исследование подтвердило нашу гипотезу о возможности искусственного клинического репрограммирования макрофагов *in vivo* в тканях пародонта, то есть в очаге хронического воспаления в условиях реального времени и реальной среды функционирования этих клеток. Тот факт, что под влиянием обедненной клеточными элементами аутосыворотки крови в основной группе больных в течение месяца произошло существенное увеличение пропорции макрофагов фенотипа М2 при одновременном уменьшении пропорции М1 фенотипа, соответствует имеющимся в литературе предположениям [12, 14] и свидетельствует о высокой эффективности новой предложенной методики.

Следует также указать, что выявленные морфологические различия в состоянии тканей пародонта в обеих группах больных полностью коррелировали с клинической картиной.

Заключение

Таким образом, полученные результаты позволяют рекомендовать разработанную новую клиническую методику репрограммирования макрофагов тканей пародонта *in vivo* в качестве дополнительного метода коррекции иммунного ответа в составе комплексного пародонтологического лечения хронического пародонтита. В отличие от известных клеточных биотехнологий репрограммирования макрофагов *in vitro*, эта методика существенно менее трудозатратна и реализуется непосредственно в присутствии больного.

Литература/References

1. Ярилин А.А. Основы иммунологии. Москва: ГЭОТАР-Медиа. 2010: 744.
2. Gleissner C.A. Macrophage phenotype modulation by CXCL4 in atherosclerosis. *Front. Physiology*. 2012; 13 (3): 1. doi: 10.3389/fphys.2012.00001.
3. Moore K.J., Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011; 145: 341-355. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.005.
4. Лямина С.В., Мальшев И.Ю. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа. *Фундаментальные исследования*. 2014; 10: 930–935.
5. Varol C., Mildner A., Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*. 2015; 33: 643-675. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.
6. Lugo-Villarino G., Verollet C., Maridon-neau-Parini I., Neyrolles O. Macrophage polarization: convergence point targeted by mycobacterium tuberculosis and HIV. *Front. Immunol*. 2011; 2: 43. doi: 10.3389/fimmu.2011.00043.
7. Tarique A.A., Logan J., Thomas E., Holt P.G., Sly P.D., Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2015; 53 (5): 676-688. doi: 10.1165/rcmb.2015-00120C.
8. Мальшев И.Ю. Эпигенетические, посттранскрипционные и метаболические механизмы репрограммирования макрофагов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015; 3: 118–127.

9. Мусина Л.А., Муслимов С.А., Лебедева А.И., Волгарева Е.А. Ультраструктура макрофагов, выявляемых при имплантации аллогенного биоматериала Аллоплант. Морфология. 2006; 129 (1): 53–56.
10. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdts S., Gordon S., Hamilton J.A., Ivashkiv L.B., Lawrence T., Locati M., Mantovani A., Martinez F.O., Mege J.L., Mosser D.M., Natoli G., Saeij J.P., Schultze J.L., Shirey K.A., Sica A., Suttles J., Udalova I., van Ginderachter J.A., Vogel S.N., Wynn T.A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014; 41 (1): 14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
11. Gao J., Scheenstra M.R., van Dijk A., Veldhuizen E.J.A., Haagsman H.P. A new and efficient culture method for porcine bone marrow-derived M1 and M2-polarized macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2018; 200: 7-15. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.04.002.
12. Schneider A., Wood H.N., Geden S., Greene C.J., Yates R.M., Masternak M.M., Rohde K.H. Growth hormone-mediated reprogramming of macrophage transcriptome and effector functions. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 19348. doi: 10.1038/s41598-019-56017-6.
13. Шиманский Ш.Л., Суворова И.А., Чиликин В.Н., Малышев И.Ю., Румянцев В.А. Роль фенотипа и пластичности макрофагов в развитии воспалительной реакции при экспериментальном гингивите у мышей разных генетических линий. *Dental forum.* 2015; 1: 21-24.
14. Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милякова М.Н. Макрофаги. Разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. *Гены & Клетки.* 2016; 11 (1): 9–17.

Румянцев Виталий Анатольевич (контактное лицо) – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пародонтологии ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинской университет Минздрава России; 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4; Тел. 8-906-554-35-07; e-mail: rutyancev_v@tvgtmu.ru.

Поступила 14.09.2022.