

ТЕРАПИЯ ПАРОДОНТИТА ФАКТОРОМ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЯ: ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

В.П. Мудров^{1,2}, Г.А. Демяшкин⁵, И.С. Фоменков³, М.С. Мяндиев⁴, С.Ю. Иванов⁵, С.П. Казаков^{1,6}

¹ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

²ГБУЗ Диагностический клинический центр №1 департамента здравоохранения г.Москвы

³ФГУП ГлавУпДК «Мединцентр» МИД России, г.Москва

⁴ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы", г.Москва

⁵ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, г.Москва

⁶ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России, г.Москва

Резюме

Восстановление здоровья пародонта и регенерация утраченных тканей пародонта являются конечной целью пародонтологического лечения. Одним из перспективных подходов к стимуляции регенерации пародонта представляется применение гидрогелей и различных ростовых факторов, способствующих заселению скаффолда популяциями фибробластов с последующим формированием зрелой соединительной ткани связки периодонта. Пациенты с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степени тяжести (n=70, возраст 49-69 лет) находились на лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии УКБ № 4. Лечение проводили препаратом из комплекса биорезорбируемых карбогидратов и рекомбинантного человеческого фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A). Взятие биопсийного материала осуществляли непосредственно перед введением препарата в пародонтальный карман и через 14 дней после процедуры. До лечения в препаратах десны отмечали выраженное хроническое воспаление с преобладанием лимфоцитов, умеренный отёк и расхождение волокон стромального компонента, наблюдали признаки хронического умеренного активного воспаления. После лечения в структурированных волокнах межклеточного вещества были обнаружены коллагеновые волокна, построенные из коллагена III типа и коллагена I типа, что характерно для сформированной соединительной ткани. Таким образом, терапия хронического пародонтита гидрогелем с VEGF-A является перспективным направлением для дальнейших исследований, поскольку имеет потенциал воздействия не только стимулирующего регенерацию тканей пародонта, но и эффект местного противовоспалительного лечения.

Ключевые слова: пародонтит, гидрогель, фактор роста эндотелия сосудов, пародонтальная связка.

DOI: 10.58953/15621790_2023_14_1-2_39

THERAPY OF PERIODONTITIS WITH VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR BASED ON HYDROGEL: IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS

V.P. Mudrov^{1,2}, G.A. Demyashkin⁵, I.S. Fomenkov³, M.S. Myandiev⁴, S.Y. Ivanov⁵, S.P. Kazakov^{1,6}

¹FGBOU DPO "Russian Medical Academy of Continuing Professional Education" of the Ministry of Health of Russia

²GBUZ Diagnostic Clinical Center No. 1 of the Moscow Department of Health

³FGUP GlavUpDK "Medincenter" of the Ministry of Foreign Affairs of Russia

⁴Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba

⁵FGOU VPO First MGPU named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of Russia

⁶FGBU "GVKG named after N.N. Burdenko" of the Ministry of Defense of Russia

Summary

Regeneration of lost periodontal tissues is the ultimate goal of periodontal treatment. One of the promising approaches to stimulating periodontal regeneration is the use of hydrogels and various growth factors that contribute to the colonization of the scaffold with fibroblast populations, followed by the formation of mature connective tissue of the periodontal ligament. Patients with chronic generalized periodontitis of mild and moderate severity (n=70, age

49-69 years) were treated in the Department of maxillofacial surgery of the UKB No. 4. Treatment was carried out with a preparation from a complex of bioresorbable carbohydrates and recombinant human vascular endothelial growth factor (VEGF-A). The biopsy material was taken immediately before the introduction of the drug into the periodontal pocket and 14 days after the procedure. Prior to treatment, pronounced chronic inflammation with a predominance of lymphocytes, moderate edema and divergence of the fibers of the stromal component were noted in the gum preparations, signs of chronic moderate active inflammation were observed. After treatment, collagen fibers constructed from type III collagen and type I collagen were found in the structured fibers of the intercellular substance, which is characteristic of the formed connective tissue. Thus, the therapy of chronic periodontitis with a hydrogel with VEGF-A is a promising direction for further research, since it has the potential to influence not only stimulating the regeneration of periodontal tissues, but also the effect of local anti-inflammatory treatment.

Keywords: periodontitis, hydrogel, vascular endothelial growth factor, periodontal ligament.

Введение

Пародонтит — распространенное хроническое воспалительное заболевание зубочелюстной области человека. Распространенность заболеваний пародонта, включающих гингивит и пародонтит, составляет до 20-50% населения во всем мире [8]. От 5 до 20% населения страдает хроническим тяжелым пародонтитом, а пародонтитом легкой и средней степени тяжести страдает большинство взрослых. Глобальная стандартизированная по возрасту распространенность заболевания составляет 11,2% [4]. При этом пародонтит связан с повышенным риском развития ишемической болезни сердца, ревматоидного артрита, хронической болезни почек и др. [9].

Восстановление здоровья пародонта и регенерация утраченных тканей пародонта всегда являются конечной целью пародонтологического лечения. В настоящее время регенерация тканей пародонта все еще остается сложной задачей. Сейчас существует широкий выбор методов хирургического и консервативного лечения пародонтита, а также их комбинации, целью которых является восстановление опорного аппарата зуба. Однако до сих пор желаемых результатов лечения добиться удается не всегда. Одним из перспективных подходов к стимуляции регенерации пародонта представляется применение гидрогелей и различных ростовых факторов, способствующих заселению скаффолда определенными популяциями клеток (фибробласты, остеобласты и др.) с последующим формированием зрелой соединительной ткани связки пародонта, а также цемента и альвеолярной костной ткани [14]. В комплексе с противомикробными препаратами, такими как сурфактин и гербмедотцин, созданы гидрогели, состоящие из нановолокон целлюлозы и наночастиц к-каррагенановых олигосахаридов. Выбранные агенты обладают сильной антибактериальной активностью в отношении пародонтальных патогенов, таких как *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Pseudomonas aeruginosa* [5].

Одной из самых удобных и доступных базовых суб-

станций для биodeградируемых гидрогелей является карбоксиметилцеллюлоза [13]. Тем не менее, данных об эффективности такого лечения недостаточно.

В качестве источника факторов роста рассматривается плазма, обогащенная тромбоцитами (PRP). До сих пор данные об эффективности ее применения при пародонтите противоречивы, однако, на основании метаанализа 15 исследований, M. Saleem с соавторами показали обоснованность использования PRP в дополнение к костным графтам [12]. В то же время, преимущество применения PRP перед изолированными факторами роста не доказано.

Существуют подходы с использованием инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [1]. Описаны эффекты сочетанного применения фактора роста фибробластов и VEGF, способствующие остеогенной дифференцировке и формированию костной ткани [7]. Экспериментальная направленная костная регенерация с использованием инъекционного геля для доставки сосудистого эндотелиального фактора роста продемонстрировала, что применение VEGF-A усиливает ранний ангиогенез, а в более поздние сроки регенерацию кости [6].

Таким образом, представляется целесообразным исследовать возможность лечения больных пародонтитом при помощи биodeградируемого гидрогеля на основе карбоксиметилцеллюлозы с содержанием рекомбинантного человеческого фактора роста эндотелия сосудов.

Цель исследования:

оценка эффективности лечения пародонтита легкой и средней степени тяжести гидрогелем, содержащим VEGF.

Для реализации цели были поставлены следующие задачи. С помощью комплекса гистологических и иммуногистохимических (ИГХ) методов оценить:

1. активность воспалительной реакции (характеристика инфильтрата, VEGF-A);
2. состояние компонентов межклеточного матрикса (коллагены I и III типов)
3. эпителизацию пораженной поверхности.

Материалы и методы

36 пациентов с легкой степенью тяжести хронического генерализованного пародонтита в возрасте 49-69 лет и 34 пациента со средней степенью тяжести хронического генерализованного пародонтита в возрасте 54-68 лет находились на лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии УКБ № 4 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России с жалобами на болезненность, отек и кровоточивость десен. Лечение проводили препаратом «Ребон. Гель для дёсен» (ООО «ДжиЭф Групп», Россия), представляющим собой комплекс биорезорбируемых карбогидратов на основе карбоксиметилцеллюлозы, формирующей клеточную основу, аналогичную внеклеточному матриксу зубодесневого кармана с обеспечением баланса рН тканей и рекомбинантного человеческого фактора роста эндотелия сосудов (rhVEGF).

Взятие биопсийного материала осуществляли непосредственно перед введением препарата в пародонтальный карман и через 14 дней после процедуры. На публикацию данного случая с прилагаемыми иллюстрациями было получено письменное информированное согласие от пациентов. Клинико-морфологическое исследование биопсийного материала пародонта проводили с помощью световой микроскопии и иммуногистохимического (ИГХ) метода.

Морфологическое исследование. Фрагменты пародонта фиксировали в 10% нейтральном формалине, забуференным по Лилли (при рН 7,2-7,4), заливали в парафин по стандартной методике. После депарафинизации и регидратации парафиновых срезов проводили ИГХ-исследование по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Германия).

В качестве первичных использовали мышинные антитела (Abcam, Великобритания) VEGF-A (clone ab46154; 1:200), Collagen I (clone abab138492; 1:400), Collagen III (clone ab23445; 1:400). Вторичные антитела – универсальные («Cell Marque», США). Для каждого маркера выполняли контрольные исследования с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера; срезы промывали под проточной водой; дегидратировали и заключали в бальзам.

Визуализацию биопсийного материала выполняли на светооптическом микроскопе Carl Zeiss Lab.A1 («Carl Zeiss», Германия), совмещенном с видеокamerой AxioCam ERc5s («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия) и программным обеспечением ZEN Lite.

Компьютерную морфометрию осуществляли при помощи системы анализа изображения с открытым кодом ImageJ 1.51. Для оценки интенсивности ИГХ

реакции определяли площадь окрашенных объектов в 10 случайно отобранных полях зрения при увеличении $\times 400$.

Статистический анализ. Полученные результаты были статистически обработаны с использованием программного пакета SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США), включая расчет средних арифметических величин с ее предельными отклонениями и среднеквадратичной ошибки. Соответствие данных нормальному распределению проверяли по критерию Колмогорова-Смирнова. Для оценки достоверности различий средних значений между группами использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. При отсутствии нормального распределения данных использовали непараметрический критерий F. Wilcoxon (Statistical methods for research workers) с уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Микроскопическое исследование

До лечения в некоторых препаратах десны отмечали следующие изменения: выраженное хроническое воспаление с преобладанием лимфоцитов, умеренный отёк и расхождение волокон стромального компонента. Многослойный плоский неороговевающий эпителий с участками паракератоза и зонами интраэпителиальной воспалительной инфильтрации, что подтверждает активный хронический пародонтит легкой степени. У остальных пациентов в десне наблюдали признаки хронического умеренного активного воспаления (наличие полиморфно-ядерных лейкоцитов, ПМЯЛ), умеренного отёка, разволокнения связки периодонта с деструкцией коллагеновых волокон, выраженной неоваскуляризации, а также фокусы фибриноидного некроза преимущественно в собственной пластинке слизистой оболочки. Описанная морфологическая картина соответствует пародонтиту средней тяжести. После лечения во всех образцах обнаружили нормальную гистоархитектонику слизистой десны: эпителий с сохранной стратификацией, количество кровеносных и лимфатических сосудов стромы – умеренное, вокруг которых признаки слабой лимфоцитарно-гистиоцитарной инфильтрации. В более глубоких слоях – плотная оформленная волокнистая соединительная ткань, образованная коллагеновыми волокнами, расположенными упорядоченно в параллельных пучках (Рис. 1).

Иммуногистохимическое исследование

При ИГХ-исследовании пародонта до лечения у всех пациентов II этапа был обнаружен VEGF-A в иммунокомпетентных клетках, фибробластах и ЭЦМ, а после лечения – снижение выявления

Рисунок 1.

Морфологическое исследование десны и пародонта. Окраска: гематоксилин эозин. Увеличение $\times 400$ (вставка $\times 100$). Слева – до лечения, справа – после лечения

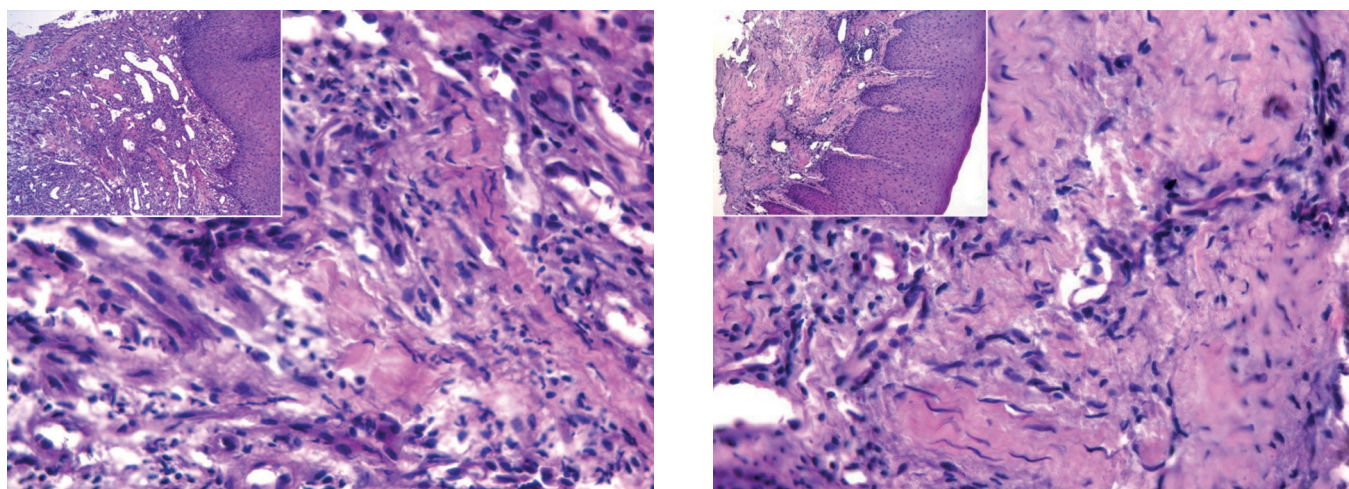
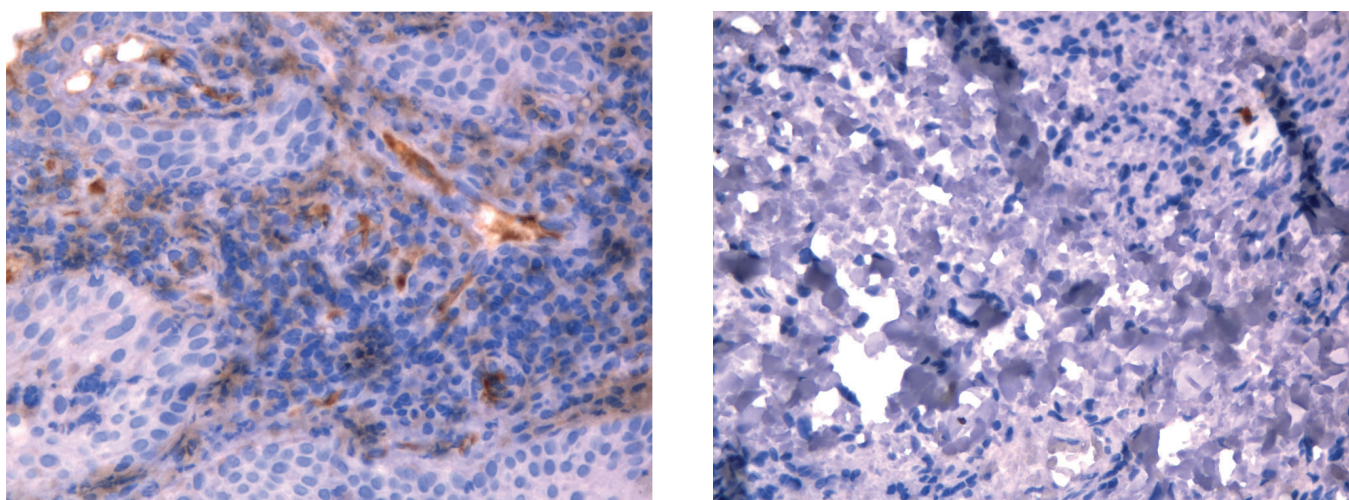


Рисунок 2.

Иммуногистохимическое исследование VEGF-A до и после иммулотропного лечения хронического пародонтита (увеличение $\times 400$). Слева – до лечения, справа – после лечения



в 3,0 раза в этих клетках и отсутствие в межклеточном веществе (Рис. 2).

Коллаген I и III типов выявили как до, так и после лечения при достоверных различиях в степени их интенсивности и распределения в структурах десны (Рис. 3, 4). Отмечено преобладание коллагена I типа после лечения в структурированных волокнах межклеточного вещества и фибробластах (3 балла; $62,5 \pm 4,8\%$, $p < 0,05$). До лечения иммунопозитивные реакции для коллагена III типа выявили в фибробластах и внеклеточном матриксе (2 балла; $48,2 \pm 3,7\%$, $p < 0,05$), а после лечения в матриксе – увеличение интенсивности таких реакций (3 балла; $72,3 \pm 3,9\%$, $p < 0,05$). В структурированных волокнах межклеточного вещества были обнаружены коллагеновые волокна, построенные из коллагена III типа и кол-

лагена I типа, что характерно для сформированной соединительной ткани. Это свидетельствует об активации пластических процессов, приводящих к укреплению пародонтальной связки на фоне проводимой иммулотропной терапии с ростовыми факторами.

Известно, что в регуляции ангиогенеза играют критическую роль хондроциты, особенно во время эндохондральной оссификации при заживлении переломов. В эксперименте со специфичной для хондроцитов делецией FOXO1 была снижена способность этих клеток индуцировать образование эндотелиоцитов *in vitro* и снижена экспрессия VEGF-A. Прямое связывание FOXO1 с промотором VEGF-A и индуцированная FOXO1 транскрипционная активность VEGF-A в хондроцитах дает представление о механизме регуляции ангиогенеза

Рисунок 3.

Иммуногистохимическое исследование состава коллагена I типа пародонтальной связки до и после лечения (увеличение $\times 400$). Слева – до лечения, справа – после лечения

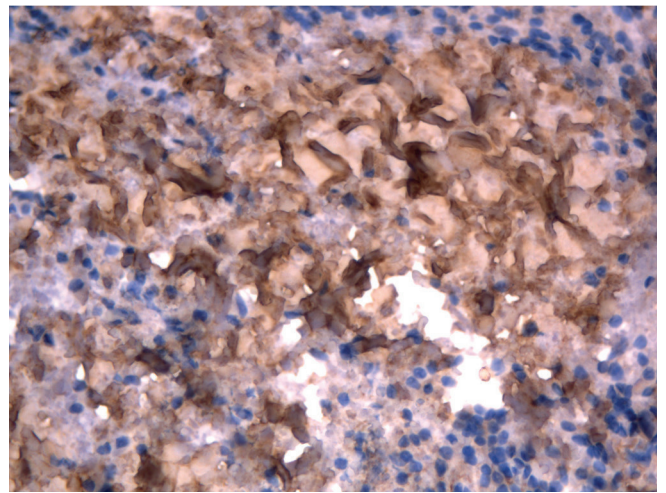
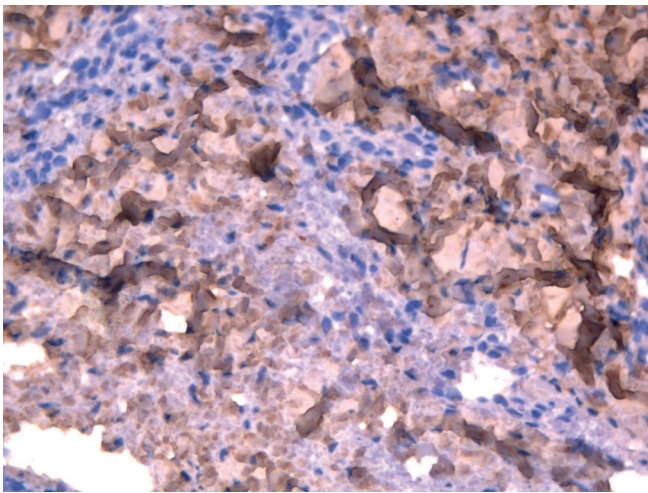
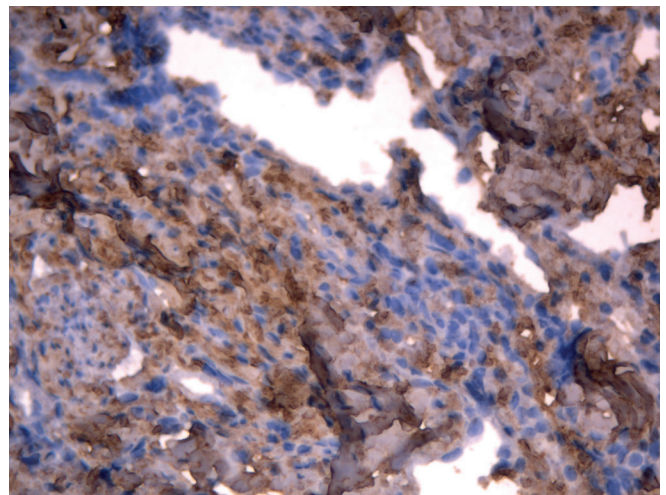
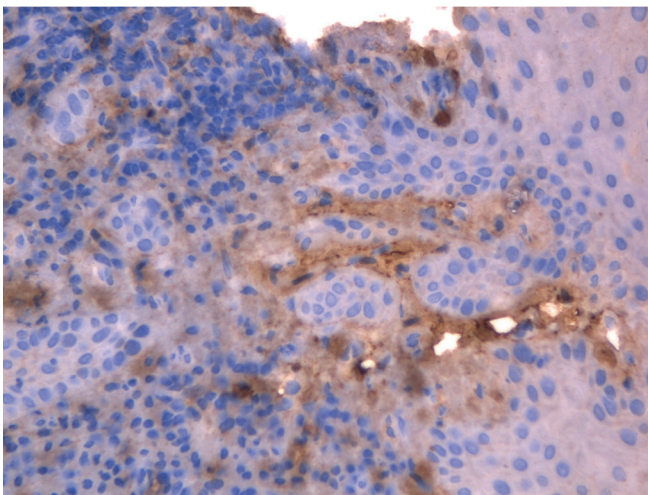


Рисунок 4.

Иммуногистохимическое исследование состава коллагена III типа пародонтальной связки до и после лечения (увеличение $\times 400$). Слева – до лечения, справа – после лечения



во время заживления переломов. Хотя экспериментальная модель заживления переломов может быть не вполне идентичной реальным процессам, тем не менее, эти результаты дают представление о том, как хондроциты могут способствовать заживлению переломов [16].

Результаты исследования представляют интерес ввиду двунаправленности действия препарата. Была выявлена не только стимуляция регенерации, но и выраженный противовоспалительный эффект гидрогеля. Исследования показали, что VEGF усиливает остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток посредством внутриклеточного механизма. Происходит уменьшение глубины зондирования, увеличение клинического уровня прикрепления и заполнение глубоких внутрикостных дефектов [3].

При этом в дополнение к элиминации лимфоцитарного инфильтрата наблюдалось резкое снижение уровня VEGF-A, особенно в межклеточном матриксе. Последнее согласуется с результатами других исследований о диагностической значимости снижения уровня VEGF-A в пародонтальной жидкости при успешном лечении пародонтита [10,15]. Было показано в отдельных исследованиях, что уровень VEGF в сыворотке крови снижался после приема антирезорбтивных средств на 7-й и 21-й дни [11]. Эти данные позволяют предположить, что исследование этого биомаркера в десневой жидкости является клинически значимым и может применяться в клинической лабораторной диагностике пародонтита.

Заключение

В настоящее время регенерация тканей пародонта все еще остается сложной задачей. Поэтому необходимо изучить развитие тканей пародонта, принципы и процессы которого можно использовать для разработки новых стратегий регенерации тканей пародонта.

Терапия пародонтита гидрогелем, представляющим собой аналог экстрацеллюлярного матрикса с необходимыми pH-свойствами и содержанием VEGF-A, является перспективным направлением для дальнейших исследований, поскольку имеет потенциал воздействия не только стимулирующего регенерацию тканей пародонта, но и эффект местного противовоспалительного лечения.

Список литературы

1. Devi R. *Clinical evaluation of insulin like growth factor-I and vascular endothelial growth factor with alloplastic bone graft material in the management of human two wall intra-osseous defects*//*Journal of clinical and diagnostic research*. 2016. doi.org/10.7860/jcdr/2016/21333.8476
2. Fujitani T., Aoyama N., Hirata F., Minabe M. *Association between periodontitis and vascular endothelial function using noninvasive medical device - A pilot study* // *Clinical and experimental dental research*. - 2020. - Vol. 6. - P.576-582.
3. Gamal A., Abdel-Ghaffar K., Iacono V. *Gingival crevicular fluid vascular endothelial cell growth factor and platelet-derived growth factor-BB release profile following the use of perforated barrier membranes during treatment of intrabony defects: a randomized clinical trial*// *J Periodontal Res*. - 2016. - Vol.51. - P.407-416.
4. Holtfreter B., Albandar J., Dietrich T. et al. *Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA periodontal epidemiology working group; Joint EU/USA periodontal epidemiology working group* // *Journal of clinical periodontology*. - 2015. - Vol.42. - P. 407-412.
5. Johnson A., Kong F., Miao S. et al. *Therapeutic effects of antibiotics loaded cellulose nanofiber and κ -carrageenan oligosaccharide composite hydrogels for periodontitis treatment* // *Scientific Reports*. 2020; 10: 18037. doi: 10.1038/s41598-020-74845-9
6. Kaigler D., Silva E., Mooney D. *Guided bone regeneration (GBR) utilizing injectable vascular endothelial growth factor (VEGF) delivery gel* // *Journal of Periodontology*. -2013. - Vol. 84. - P.230-238.
7. Lee J., Um S., Jang J., Seo B. *Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells*// *Cell Tissue Res*. - 2012. - Vol.348. - P.475-484.
8. Nazir M. *Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention*//*International Journal of Health Sciences*.- 2017. - Vol. 11. - P. 72-80.
9. Panagakos F, Scannapieco F. *Periodontal inflammation: from gingivitis to systemic disease?*// *Gingival diseases - their aetiology, prevention and treatment*. Ed. F. Panagakos, R. Davies, 2011. <https://doi.org/10.5772/37923> (дата обращения 23.06. 2023)
10. Pannicker J., Mehta D. *Effects of scaling and root planing on gingival crevicular fluid vascular endothelial growth factor level in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus: A clinicobiochemical study*// *Journal of Indian Society of Periodontology*. -2016. - Vol.20. - P.244-248.
11. Papadopoulou E., Nicolatou-Galitis O., Pappasotiropoulou I. et al. *The use of crevicular fluid to assess markers of inflammation and angiogenesis, IL-17 and VEGF, in patients with solid tumors receiving zoledronic acid and/or bevacizumab/* *Support Care Cancer*. - 2020. - Vol.28. - P.177-184.
12. Saleem M., Pisani F., Zahid F. et al. *Ad-junctive platelet-rich plasma (PRP) in infrabony regenerative treatment: a systematic review and RCT's meta-analysis*// *Stem Cells Int*. 2018 Mar 19;2018:9594235. doi: 10.1155/2018/9594235.
13. Sannino A., Demitri C., Madaghiele M. *Bio-degradable cellulose-based hydrogels: design and applications*// *Materials*. - 2009. - Vol. 2. - P. 353-373.
14. Siaili M., Chatzopoulou D., Gillam D. *An overview of periodontal regenerative procedures for the general dental practitioner*//*The Saudi Dental Journal*. - 2018. - Vol.30. - P. 26-37.
15. Zekeridou A., Giannopoulou C., Cancela J. et al. *Effect of initial periodontal therapy on gingival crevicular fluid cytokine profile in subjects with chronic periodontitis*//*Clinical and Experimental Dental Research*.- 2017. - Vol.3. - P.62-68.
16. Zhang C., Feinberg D., Alharbi M. et al. *Chondrocytes promote vascularization in fracture healing through a FOXO1-dependent mechanism* // *Journal of bone and mineral research*.- 2019. - Vol.34. - P.547-556.