

© Team of authors, 2022 / © Коллектив авторов, 2022

## Morphological changes in periodontal tissues under the influence of clinical methods of reprogramming macrophages

V.A. Rumyantsev <sup>1</sup>, A.G. Denis <sup>2</sup>, Sh.L. Shimansky <sup>1</sup>, V.G. Shestakova <sup>1</sup>,  
S.A. Donskov <sup>1</sup>, A.V. Blinova <sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBEI HE Tver State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Tver, Russia

<sup>2</sup>Dobry Doctor LLC Family Center, Tver, Russia

Contacts: Denis Anna Grigorievna – e-mail: anna.denis@mail.ru

## Морфологические изменения в тканях пародонта под влиянием клинической методики репрограммирования макрофагов

В.А. Румянцев <sup>1</sup>, А.Г. Денис <sup>2</sup>, Ш.Л. Шиманский <sup>1</sup>, В.Г. Шестакова <sup>1</sup>,  
С.А. Донсков <sup>1</sup>, А.В. Блинова <sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава РФ, Тверь, Россия

<sup>2</sup>Семейный центр «ООО Добрый доктор», Тверь, Россия

Контакты: Денис Анна Григорьевна – e-mail: anna.denis@mail.ru

## 临床巨噬细胞重编程影响下牙周组织的形态学变化

V.A. Rumyantsev <sup>1</sup>, A.G. Denis <sup>2</sup>, Sh.L. Shimansky <sup>1</sup>, V.G. Shestakova <sup>1</sup>,  
S.A. Donskov <sup>1</sup>, A.V. Blinova <sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBEI HE Tver State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Tver, Russia

<sup>2</sup>Dobry Doctor LLC Family Center, Tver, Russia

通讯作者: Denis Anna Grigorievna – e-mail: anna.denis@mail.ru

Doi: 10.25792/HN.2022.10.4.8-15

**Objective of the study** – to study morphological changes in periodontal tissues under the influence of a novel clinical technique of macrophages reprogramming using autologous blood serum and to assess the method effectiveness at the cellular level.

**Material and methods.** Using histomorphology and morphometry, we studied gingival tissue sections of 20 volunteers from 35 to 44 years old – patients with moderate chronic generalized periodontitis – obtained at the beginning and after one month of conservative preoperative preparation. There were 4 men and 6 women in each of the main group and comparison group. The preparation included individual and professional oral hygiene measures, selective grinding and temporary splinting of movable teeth where indicated, as well as local conservative anti-microbial and anti-inflammatory treatment. In addition, a novel in vivo method of clinical macrophage reprogramming was implemented in the main group, but not in the comparison group. Based on the experimental studies, we developed a clinical technology for reprogramming macrophages in periodontal tissues from the inflammation-supporting phenotype M1 to the anti-inflammatory phenotype M2. The method consists in obtaining autologous venous blood serum depleted of cellular elements but containing many factors of macrophage reprogramming. Such serum was obtained directly beside the patient by double centrifugation of the whole blood with “soft start” at 10 000 rpm and injected immediately submucosally in the mucogingival fold in the areas of inflammation. Under the influence of the autologous serum, there is a gradual reprogramming of macrophages into the M2 phenotype.

**Results.** Histomorphological assessment showed the absence of inflammatory infiltration in the main group after the end of treatment. The composition of the infiltrate changed during this period: the mean decrease in the number of neutrophilic leukocytes reached 31,0%, lymphocytes – 11,2%, plasma cells – 6,2%, macrophages – 4,8%. The number of fibroblasts increased. Macrophages of M2 phenotype became predominant (82,3%) over the M1 phenotype (17,7%). The morphological index of macrophages in the main group decreased from 2,9 at the beginning to 0,2 at the end of the observation period, i.e. by 14,5 times. In the comparison group, where the technique was not used, the morphological index was 0,6 at the end of observation, which also confirms an increase in the proportion of M2 phenotype of macrophages, but to a lesser extent than in the main group – only by 4,8 times.

**Conclusion.** Histomorphological and morphometric comparative study of gingival biopsy specimens revealed high efficiency of the new clinical technique of periodontal tissue macrophage reprogramming into anti-inflammatory M2 phenotype. The method can be used in addition to traditional complex treatment of inflammatory periodontal disease.

**Keywords:** periodontium, chronic generalized periodontitis, inflammation, autologous serum, macrophage reprogramming, histomorphological study.

**Conflicts of interest.** The authors have no conflicts of interest to declare.

**Funding.** There was no funding for this study

**For citation:** Rumyantsev V.A., Denis A.G., Shimansky Sh.L., Shestakova V.G., Donskov S.A., Blinova A.V. **Morphological changes in periodontal tissues under the influence of clinical methods of reprogramming macrophages. Head and neck. Russian Journal. 2022;10(4):8–15**

The authors are responsible for the originality of the data presented and the possibility of publishing illustrative material – tables, drawings, photographs of patients.

**Цель** – определение морфологических изменений в тканях пародонта под влиянием новой клинической методики репрограммирования макрофагов с помощью аутосыыворотки крови и оценка ее эффективности на клеточном уровне.

**Материал и методы.** С помощью гистоморфологического и морфометрического методов изучены срезы 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 и группе сравнения были по 4 мужчин и 6 женщин в каждой. Подготовка включала индивидуальную коррекцию гигиены полости рта, профессиональную гигиену, избирательное пришлифовывание и временное шинирование подвижных зубов по показаниям, а также местное консервативное противомикробное и противовоспалительное лечение. В основной группе, помимо этого, дополнительно реализовывали новый метод клинического репрограммирования макрофагов *in vivo*, а в группе сравнения этого не делали. Основываясь на экспериментальных исследованиях, разработали клиническую технологию репрограммирования макрофагов в тканях пародонта из поддерживающего воспаление фенотипа M1 в противовоспалительный фенотип M2. Она заключается в получении аутологичной обедненной клеточными элементами, но содержащей много факторов репрограммирования макрофагов, сыворотки венозной крови. Такую сыворотку получали непосредственно возле больного путем двойного центрифугирования цельной крови с «мягким стартом» при 10 000 об/мин и сразу же вводили подслизисто в области переходной складки в участках воспаления. Под влиянием такой аутосыыворотки происходит постепенное репрограммирование макрофагов в фенотип M2.

**Результаты.** Гистоморфологические исследования показали отсутствие воспалительной инфильтрации в основной группе после окончания лечения. За этот период состав инфильтрата изменился: уменьшилось число нейтрофильных лейкоцитов: в среднем – на 31,0%, лимфоцитов – на 11,2%, плазматических клеток – на 6,2%, макрофагов – на 4,8%. Увеличилось число фибробластов. В процентном соотношении стали преобладать макрофаги фенотипа M2 (82,3%) против 17,7% фенотипа M1. Морфологический индекс макрофагов в основной группе изменился с 2,9 в начале до 0,2 в конце периода наблюдения, т.е. в 14,5 раза. В группе сравнения, где методика не использовалась, в конце наблюдения морфологический индекс составил 0,6, что также подтверждает увеличение пропорции фенотипа M2 макрофагов, но в меньшей степени, чем в основной группе – только в 4,8 раза.

**Заключение.** В ходе гистоморфологического и морфометрического сравнительного исследования биоптатов десны выявили высокую эффективность новой клинической методики репрограммирования макрофагов тканей пародонта в противовоспалительный фенотип M2, которую можно использовать в дополнение к традиционному комплексному лечению воспалительных заболеваний пародонта.

**Ключевые слова:** пародонт, хронический генерализованный пародонтит, воспаление, аутосыыворотка крови, репрограммирование макрофагов, гистоморфологическое исследование

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Для цитирования:** Румянцев В.А., Денис А.Г., Шиманский Ш.Л., Шестакова В.Г., Донсков С.А., Блинова А.В. **Морфологические изменения в тканях пародонта под влиянием клинической методики репрограммирования макрофагов. Head and neck. Голова и шея. Российский журнал. 2022;10(4):8–15**

Авторы несут ответственность за оригинальность представленных данных и возможность публикации иллюстративного материала – таблиц, рисунков, фотографий пациентов.

本研究的目的是：研究在使用自体血清重新编程巨噬细胞的新临床技术影响下牙周组织的形态学变化，并评估细胞水平上的方法有效性。

材料和方法：使用组织形态学和形态计量学，我们研究了20名35至44岁的志愿者（中度慢性全身性牙周炎患者）在保守术前准备开始和一个月后获得的牙龈组织切片。主要组和对照组各有4名男性和6名女性。准备工作包括个人和专业口腔卫生测量仪、选择性磨牙和临时夹板，以及局部保守的抗微生物和抗炎治疗。此外，在主要

группе была применена новая методика репрограммирования макрофагов, но в контрольной группе ее не применяли. На основании экспериментальных данных мы разработали клиническую технологию репрограммирования макрофагов в тканях пародонта из поддерживающего воспаления фенотипа M1 в противовоспалительный фенотип M2. Она заключается в получении аутологичной обедненной клеточными элементами, но содержащей большое число факторов репрограммирования макрофагов сыворотки венозной крови. Такую сыворотку получают непосредственно возле больного путем двойного центрифугирования цельной крови с «мягким стартом» при 10 000 об/мин и сразу же вводят подслизисто в области переходной складки в полости рта в участках воспаления тканей пародонта. Под влиянием обедненной клеточными элементами аутосыворотки происходит постепенное репрограммирование макрофагов в фенотип M2 [19, 20].

Результаты: Оценка морфологии показала, что после завершения лечения, в основной группе не было воспаления. В этот период, состав компонентов изменился: количество нейтрофилов в среднем снизилось на 31,0%, лимфоцитов – на 11,2%, плазматических клеток – на 6,2%, макрофагов –

на 4,8%. Количество фибробластов увеличилось. Макрофагов типа M2 преобладали (82,3%), что выше, чем у макрофагов типа M1 (17,7%). В основной группе макрофагов индекс морфологии с момента наблюдения снизился с 2,9 до момента окончания наблюдения до 0,2, то есть снизился в 14,5 раза. В контрольной группе, не применявшей эту методику, индекс морфологии составил 0,6, что подтвердило увеличение макрофагов типа M2, но в меньшей степени, чем в основной группе, только на 4,8 раза.

Выводы: Для тканей пародонта морфология и морфометрия сравнительно показывают, что методика репрограммирования макрофагов в противовоспалительный фенотип M2 имеет высокую эффективность. Этот метод применим для традиционного комплексного лечения воспалительных заболеваний пародонта.

Ключевые слова: ткани пародонта, хроническое воспаление, аутологичная сыворотка, репрограммирование макрофагов, морфология тканей

Конфликт интересов: Автор не имеет конфликта интересов.

Финансирование: Эта работа не финансировалась.

Ссылка: Rumyantsev V.A., Denis A.G., Shimansky Sh.L., Shestakova V.G., Donskov S.A., Blinova A.V. Morphological changes in periodontal tissues under the influence of clinical methods of reprogramming macrophages. Head and neck. Russian Journal. 2022;10(4):8–15

Автор несет ответственность за оригинальность данных и за предоставление материалов (таблицы, рисунки, фотографии) для публикации.

## Введение

Особенностью воспалительной реакции в тканях пародонта является ее опосредование неадекватной извращенной иммунологической реакцией, приводящей либо к хронизации процесса (хронический пародонтит), либо к его бурному течению (агрессивный пародонтит) [1, 2]. Первая линия защиты непосредственно связана с клеточным компонентом, в частности с активностью нейтрофилов и макрофагов в зоне воспаления. Макрофаги дифференцируются из моноцитов периферической крови и представляют собой клетки, которые в отличие от округлых моноцитов имеют неправильные очертания и морфологически полиморфны [3–5].

В последние годы хорошо изучен механизм активации макрофагов, в т.ч. при распространенной общей хронической патологии: обструктивной болезни легких, атеросклерозе кровеносных сосудов, онкологических заболеваниях [6–9]. При этом четко сформировалось представление о дивергентной поляризации макрофагов, т.е. их способности, исходя из характеристик окружающей среды и внешних сигналов, проявлять либо про-, либо противовоспалительную активность [10–13]. Выделяют два полярных типа активированных макрофагов: M1 и M2 [14, 15]. Активация макрофагов в фенотип M1 способствует увеличению секреции провоспалительных цитокинов, как например интерлейкина-12 (ИЛ-12) [16, 17]. Такие макрофаги инициируют воспаление, при котором они проявляют цитотоксическую и бактерицидную активность. Альтернативная активация макрофагов в фенотип M2 происходит под влиянием иммунокомплексов и ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13, а также грибковой и гельминтной инфекции [2]. Существуют различные способы культивирования «поляризованных» макрофагов, репрограммирования макрофагов, все они реализуются в условиях лаборатории клеточных культур *in vitro* [4].

Ранее, основываясь на экспериментальных исследованиях [18] и предположив, что репрограммирование макрофагов

возможно проводить непосредственно в тканях *in vivo*, мы обосновали и разработали клиническую технологию репрограммирования макрофагов в тканях пародонта из поддерживающего воспаления фенотипа M1 в противовоспалительный фенотип M2. Она заключается в получении аутологичной обедненной клеточными элементами, но содержащей большое число факторов репрограммирования макрофагов сыворотки венозной крови. Такую сыворотку получают непосредственно возле больного путем двойного центрифугирования цельной крови с «мягким стартом» при 10 000 об/мин и сразу же вводят подслизисто в области переходной складки в полости рта в участках воспаления тканей пародонта. Под влиянием обедненной клеточными элементами аутосыворотки происходит постепенное репрограммирование макрофагов в фенотип M2 [19, 20].

Целью исследования явилось определение морфологических изменений в тканях пародонта под влиянием новой клинической методики репрограммирования макрофагов и оценка ее эффективности на тканевом уровне.

## Материал и методы

Для сравнительной оценки эффективности разработанной методики клинического репрограммирования макрофагов пародонта осуществили клинико-морфологическое экспериментальное исследование с участием 20 добровольцев – больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести (код МКБ: K05.31), не имеющих сопутствующих общих соматических заболеваний. После обследования всем больным проводили комплексное пародонтологическое лечение. Однако период нашего наблюдения и обследования больных охватывал только первый месяц, когда у них осуществляли подготовку к последующему хирургическому лечению с целью устранения патологических пародонтальных карманов. Эта подготовка включала индивидуальную коррекцию гигиены полости рта, профессиональную гигиену, избирательное шлифование

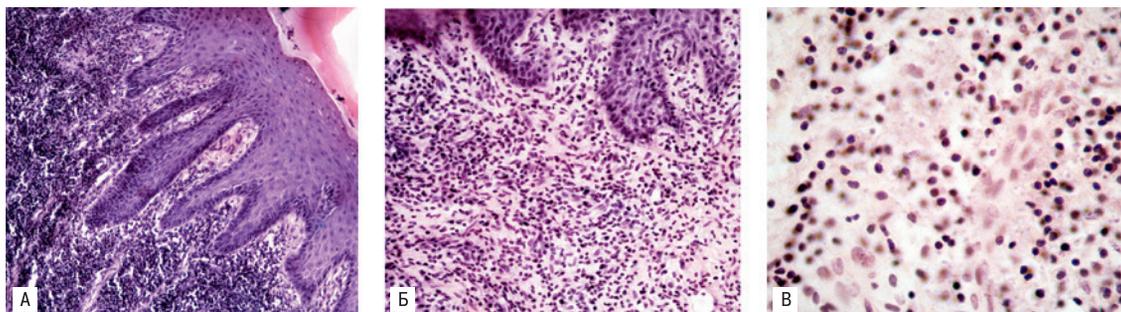


Рис. 1. Морфологические изменения в начале исследования. Акантоз и паракератоз в многослойном плоском неороговевающем эпителии. Выраженная воспалительная инфильтрация стромы, отек, полнокровные сосуды (А, Б). Преобладание макрофагов фенотипа М1 в воспалительном инфильтрате (В). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: А – 150; Б – 200; В – 400.

Figure 1. Morphological changes at the beginning of the study. Acanthosis and parakeratosis in the stratified squamous nonkeratinized epithelium. Severe inflammatory infiltration of stroma, edema, hyperemia (A, B). Predominance of macrophages of M1 phenotype in the inflammatory infiltrate (C). Hematoxylin and eosin staining. Magnification: A – 150; B – 200; C – 400.

зубов и временное шинирование подвижных зубов по показаниям, а также местное консервативное противомикробное и противовоспалительное лечение в соответствии с клиническими рекомендациями, утвержденными Стоматологической ассоциацией России (СтАР) 30.09.2014. Больных произвольно разделили на 2 равные по численности и половому составу группы: основную и группу сравнения (по 4 мужчин и 6 женщин в каждой). В основной группе помимо указанного выше лечения дополнительно реализовывали метод клинического репрограммирования макрофагов *in vivo*, а в группе сравнения этого не делали. Все добровольцы были в возрасте от 35 до 44 лет (средняя возрастная группа ВОЗ). Исследование одобрено Этическим комитетом Тверского ГМУ 25.04.2016, каждый из добровольцев давал письменное информированное согласие.

До начала лечения и в конце периода подготовки больных к хирургическому лечению (через месяц) проводили биопсийное морфологическое исследование тканей десны. Иссекали фрагменты многослойного плоского неороговевающего эпителия десны с подлежащими тканями в тех местах, где это не могло принести ощутимого вреда для больного. После этого их фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина (рН=7,2), затем проводили в изопропиловом спирте с добавлением «Iso-Prep» (ООО «ЭргоПродакшн», Россия) и заливали в гомогенизированную парафиновую среду «HISTOMIX» (ООО «ЭргоПродакшн», Россия), формируя блоки. Из парафиновых блоков изготавливали гистологические препараты толщиной 5–6 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Кроме этой методики, применяли гистохимическую окраску по Вейгерт–Ван–Гизону. Эта окраска применялась для выявления эластических и коллагеновых волокон, соединительной ткани, клеточных элементов и ядер.

Морфологический материал был разделен на 3 группы: от всех больных до начала лечения (1) и спустя месяц от его начала от больных группы сравнения (2) и основной группы (3). При изучении микроскопических препаратов оценивали динамику изменений воспалительной реакции и особенности регенерации тканей. Микроскопическое исследование изменений в тканях, фоторегистрацию и морфометрические исследования проводили с применением исследовательского тринокулярного микроскопа «Nikon Eclipse 50i» (Nikon, Япония), специализированной цифровой фотокамеры «Nikon DS-Fi2» (Nikon, Япония) и персонального компьютера, работающего под управлением

операционной системы Windows 7 с использованием специализированных морфометрических программ «NIS-Elements» (Nikon Instruments Inc., США) и «BioVision Professional» (BioVision Inc., США).

При морфометрическом исследовании материала до и после лечения определяли:

- плотность воспалительного инфильтрата (путем подсчета числа 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  $\times 400$ .

Также подсчитывали процентное соотношение фенотипов макрофагов М1 и М2. Основными отличительными морфологическими характеристиками этих фенотипов макрофагов являются: для М1 – округлая форма, для М2 – фибробластоподобная форма, 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 *t*-критерия. Проверку на нормальность распределения оценивали при помощи критерия Шапиро–Уилкса. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты обсуждения

*Морфологическая характеристика гистопрепаратов десны до лечения.* До лечения наблюдаемая картина в микропрепаратах, полученных от обеих групп больных, не отличалась. В многослойном плоском ороговевающем эпителии выявлялись акантоз и паракератоз. В ряде наблюдений отмечались истинные эрозивные дефекты с тканевым детритом на поверхности. В подлежащей соединительнотканной строме наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация, отеки, полнокровные сосуды и очаговые кровоизлияния (рис. 1А).

Морфометрические исследования показали, что воспалительный инфильтрат достаточно выражен (рис. 1Б). Плотность клеточного инфильтрата составляла  $483 \pm 12,4$  клеток в поле зрения, и он был представлен на  $34,7 \pm 1,6\%$  нейтрофильными лейкоцитами, лимфоцитами – на  $37,1 \pm 1,2\%$ , плазматическими клетками – на  $10,7 \pm 0,8\%$ , фибробластами – на  $6,1 \pm 0,3\%$ , макрофагов было обнаружено  $11,4 \pm 0,4\%$  (таблица). При этом

значительно преобладали макрофаги фенотипа M1 (74,4%) по сравнению с фенотипом M2 (25,6%, рис. 1B).

Таким образом, до начала лечения патоморфологические изменения в тканях десны больных характеризовались выраженной воспалительной инфильтрацией, изменениями со стороны соединительнотканного матрикса и многослойного плоского неороговевающего эпителия, значительным преобладанием M1 (противовоспалительного) фенотипа макрофагов.

**Морфологическая характеристика гистопрепаратов десны через месяц от начала лечения в группе сравнения.** В строме под многослойным плоским неороговевающим эпителием выявлялись полнокровные сосуды (рис. 2A), в отдельных наблюдениях – гиперкератоз эпителия (рис. 2Б) и липоматоз в подлежащей строме (рис. 2B). При окраске по Вейгерт–Ван–Гизону для выявления эластических волокон соединительной ткани наблюдали коллагеновые волокна и фиброциты. Однако среди коллагеновых волокон было обнаружено большое число сосудов, что является морфологическим признаком неполного созревания соединительной ткани (рис. 2Г).

В ряде случаев наблюдалось замедление созревания соединительной ткани, и на момент контрольного морфологического исследования было отмечено формирование только грануляционной ткани с умеренной воспалительной реакцией и выраженной васкуляризацией (рис. 2Д). Морфометрические исследования показали плотность клеточного инфильтрата –  $127 \pm 3,2$  клеток в поле зрения, а изменения его состава по сравнению с первичным исследованием заключались 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: 36,2 к 63,8% соответственно.

Таким образом, в группе сравнения без применения клинической методики репрограммирования макрофагов через месяц от начала традиционного лечения наблюдалось стихание воспалительной реакции и формирование соединительнотканного матрикса в строме с преобладанием M2 (тканевого ремоделирующего) фенотипа макрофагов. Однако имелись морфологические признаки неполного созревания соединительной ткани. Также в ряде наблюдений выявлялись патоморфологические

изменения, которые можно характеризовать как осложнения (гиперкератоз эпителия и липоматоз стромы).

**Морфологическая характеристика гистопрепаратов десны через месяц от начала лечения в основной группе.** При исследовании микропрепаратов патологических изменений в многослойном плоском неороговевающем эпителии не выявлено. В подлежащей строме воспалительная инфильтрация не наблюдалась (рис. 3A). При окраске по Вейгерт–Ван–Гизону обнаруживали зрелые коллагеновые волокна и фиброциты (рис. 3Б, 3B).

Морфометрические исследования показали отсутствие воспалительной инфильтрации. Плотность клеточного инфильтрата в соединительнотканном матриксе стромы составила  $85 \pm 2,7$  клеток в поле зрения. Состав инфильтрата по сравнению с первичным исследованием изменился: 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  $49,4 \pm 1,9\%$ . Подсчет процентного соотношения выявил значительное преобладание фенотипа M2 макрофагов: 82,3% против 17,7% фенотипа M1.

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 M2 фенотипа макрофагов.

## Обсуждение

Известно, что биотехнологии искусственного репрограммирования макрофагов *in vitro*: «сывороточная» и «цитокиновая» [16] реализуются в условиях лаборатории клеточных культур в течение от полутора до 6 суток. При этом мононуклеарные клетки выделяют из гепаринизированной венозной крови центрифугированием и затем культивируют в специальной среде, дополненной раствором L-глутамина, специального буфера, гентамицина, и другими компонентами. В научной литературе до настоящего момента не было сведений о применении технологии репрограммирования макрофагов в клинике при комплексном пародонтологическом лечении.

**Таблица** Изменения в составе клеточного инфильтрата в микропрепаратах десны в течение месяца наблюдения от начала лечения больных пародонтитом (%),  $M \pm m$ , t, p)  
**Table** Changes in the composition of cellular infiltrate in gingival micro preparations at one month of observation from the beginning of treatment in patients with periodontitis (%),  $M \pm m$ , t, p)

Клетки в составе инфильтрата Cells composing the infiltrate	До лечения (1) Before treatment (1)	t, p (1-2)	Через месяц в группе сравнения (2) At one month in the comparison group (2)	t, p (1-3)	Через месяц в основной группе (3) At one month in the main group (3)	t, p (2-3)
Нейтрофильные лейкоциты Neutrophils	$34,7 \pm 1,62$	17,7 <0,0001	$4,5 \pm 0,63$	16,9 <0,0001	$3,7 \pm 0,91$	0,7 >0,05
Лимфоциты Lymphocytes	$37,1 \pm 1,21$	6,2 <0,0001	$26,6 \pm 1,22$	6,9 <0,0001	$25,9 \pm 1,12$	0,4 >0,05
Плазматические клетки Plasma cells	$10,7 \pm 0,83$	9,4 <0,0001	$2,3 \pm 0,41$	10,8 <0,0001	$1,5 \pm 0,31$	1,6 >0,05
Фибробласты Fibroblasts	$6,1 \pm 0,31$	8,3 <0,0001	$15,6 \pm 1,10$	6,5 <0,0001	$12,9 \pm 1,03$	1,8 >0,05
Фиброциты Fibrocytes	–	–	$44,2 \pm 1,50$	–	$49,4 \pm 1,94$	2,2 <0,05
Макрофаги Macrophages	$11,4 \pm 0,40$	8,8 <0,0001	$5,8 \pm 0,52$	8,5 <0,0001	$6,6 \pm 0,40$	1,3 >0,05
Макрофаги фенотипа M2 M2-phenotype macrophages	$25,6 \pm 1,13$	22,4 <0,0001	$63,8 \pm 1,31$	31,9 <0,0001	$82,3 \pm 1,43$	9,7 <0,0001

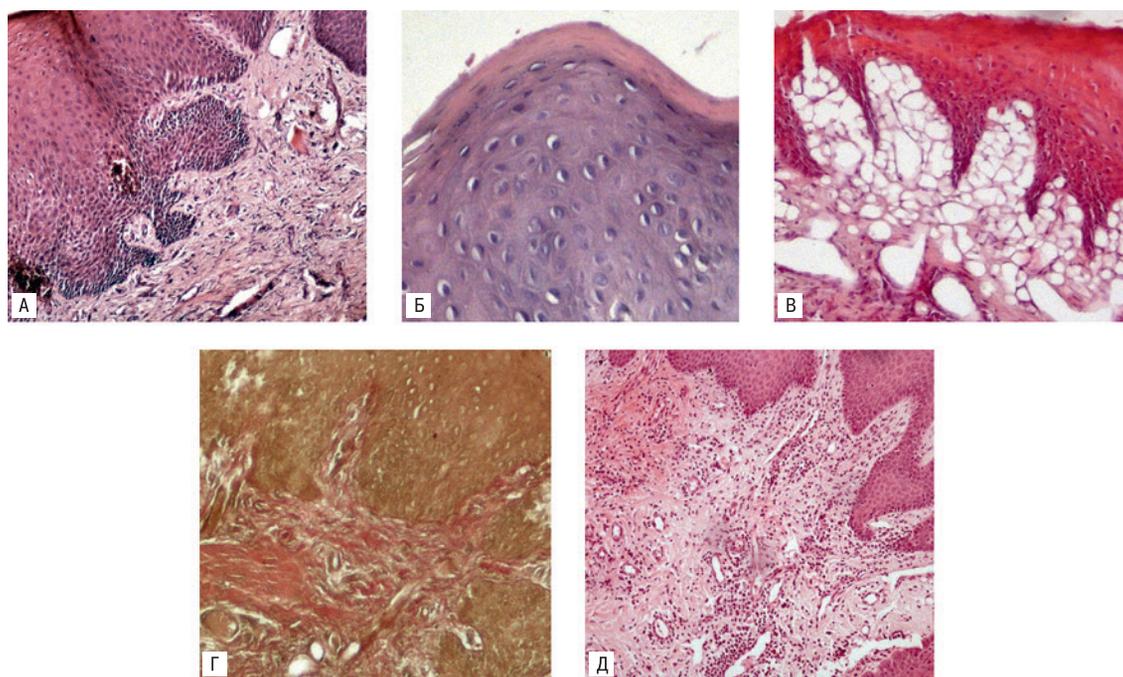


Рис. 2. Морфологические изменения в конце исследования без репрограммирования макрофагов. Акантоз (А) и гиперкератоз (Б) многослойного неороговевающего эпителия, полнокровные сосуды в строме (А). Липоматоз и расширенные сосуды под многослойным неороговевающим плоским эпителием (В). Большое количество 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 – 100; Б – 200.

Figure 2. Morphological changes at the end of the study without macrophage repro-gramming. Acanthosis (A) and hyperkeratosis (B) of the stratified non-keratinized epithelium, hyperemia in the stroma (A). Lipomatosis and dilated vessels beneath the stratified non-keratinized squamous epithelium (C). Large number of vessels within the connective tissue (incomplete maturation, D), granulation tissue with abundance of vessels (E). Hematoxylin and eosin staining (A, B, C, D), by Weigert Van Gieson (D). Magnif.: A, C, D, D – 100; B – 200.

Проведенное контролируемое исследование подтвердило нашу гипотезу о возможности искусственного клинического репрограммирования макрофагов *in vivo* в тканях пародонта, т.е. 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 [19] и свидетельствует об эффективности новой предложенной методики. Процентное содержание макрофагов в клеточном инфильтрате у больных при этом уменьшилось с  $11,4 \pm 0,4$  до  $6,6 \pm 0,4\%$  (в десне здоровых людей эта цифра меньше:  $3,5 \pm 0,64$ ). Снижение этого показателя почти в 2 раза менее чем за месяц, свидетельствует о существенном

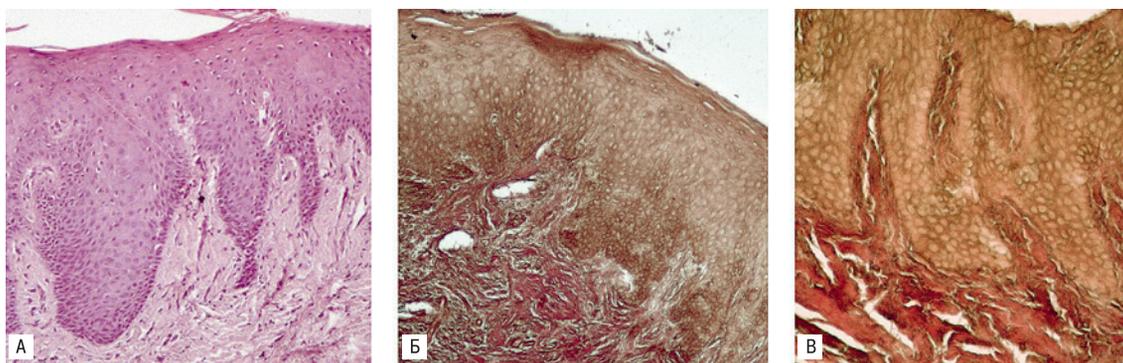


Рис. 3. Морфологические изменения в конце исследования после клинического репрограммирования макрофагов. Отсутствие воспалительной реакции в строме (А), зрелая соединительная ткань в строме (Б, В). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. – 100.

Figure 3. Morphological changes at the end of the study after clinical macrophage reprogramming. Absence of inflammatory reaction in the stroma (A), mature connective tissue in the stroma (B, C). Hematoxylin and eosin staining. Magnif. – 100.

улучшении функционального состояния тканей пародонта. При гистоморфологическом исследовании были выявлены типичные морфологические формы макрофагов фенотипа M2, что позволяет использовать такое исследование, в т.ч. и для оценки эффективности комплексного пародонтологического лечения [19]. Морфологический индекс макрофагов в основной группе изменился с 2,9 в начале исследования до 0,2 в конце периода наблюдения, т.е. в 14,5 раза. В группе сравнения, где методика не использовалась, в конце периода наблюдения морфологический индекс составил 0,6, что также подтверждает увеличение пропорции фенотипа M2 макрофагов, но в меньшей степени, чем в основной группе – только в 4,8 раза. 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 новую разработанную 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. Моисеев Д.А., Румянцев В.А., Волков С.И. и др. Морфологические аспекты взаимосвязи тканей пародонта и пульпы зубов. *Проблемы стоматологии*. 2021;17(2):77–83. <https://doi.org/10.18481/2077-7566-20-17-2-77-83>. [Moiseev D.A., Rumiyansev V.A., Volkov S.I., etc. Morphological aspects of the relationship of periodontal tissues and dental pulp. *Problems of dentistry*. 2021;17(2):77–83. <https://doi.org/10.18481/2077-7566-20-17-2-77-83> (In Russ.).]
2. Румянцев В.А., Авакова Д.Р., Блинова А.В. Модуляция иммунного ответа в пародонтологии и имплантологии: потенциал противовоспалительной, антибактериальной терапии и перспективные лекарственные формы. *Пародонтология*. 2019;24(4):372–7. <https://doi.org/10.33925/1683-3759-2019-24-4-372-377>. [Rumiyansev V.A., Avakova D.R., Blinova A.V. Modulation of the immune response in periodontology and implantology: the potential of anti-inflammatory, antibacterial therapy and promising dosage forms. *Periodontology*. 2019;24(4):372–7. <https://doi.org/10.33925/1683-3759-2019-24-4-372-377> (In Russ.).]
3. Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милакова М.Н. Макрофаги. Разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. *Гены & Клетки*. 2016;11(1):9–17. [Sarbaeva N.N., Ponomareva Yu.V., Milyakova M.N. Macrophages. A variety of phenotypes and functions, interaction with foreign materials. *Genes & Cells*. 2016;11(1):9–17 (In Russ.).]
4. Лямина С.В., Малышев И.Ю. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа. *Фундаментальные исследования*. 2014;10:930–35. [Lyamina S.V., Malyshev I.Yu. Polarization of macrophages in the modern concept of immune response formation. *Fundamental research*. 2014;10:930–35 (In Russ.).]
5. Varol C., Mildner A., Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Ann. Rev. Immunol.* 2015;33:643–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>.
6. Капитанова К.С., Науменко В.А., Гаранина А.С. и др. Перспективы использования наночастиц для репрограммирования опухолевых макрофагов в иммунотерапии злокачественных новообразований. *Биохимия*. 2019;84(7):934–52. <https://doi.org/10.1134/S0320972519070054>. [Kapitonova K.S., Naumenko V.A., Garanina A.S. and others. Prospects of using nanoparticles for reprogramming tumor macrophages in immunotherapy of malignant neoplasms. *Biochemistry*. 2019;84(7):934–52. <https://doi.org/10.1134/S0320972519070054> (In Russ.).]
7. 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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00043>.
8. Moore K.J., Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145:341–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.005>.
9. Gleissner C.A. Macrophage phenotype modulation by CXCL4 in atherosclerosis. *Front. Physiology*. 2012;13(3):1. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00001>.
10. Пашенков М.В., Муругина Н.Е., Баласова Л.С. и др. Метаболическое репрограммирование макрофагов, активированных агонистом рецептора NOD1. *Российский иммунологический журнал*. 2019;22(2–2):891–93. <https://doi.org/10.31857/S102872210006572-4>. [Paschenkov M.V., Murugina N.E., Balyasova L.S., etc. Metabolic reprogramming of macrophages activated by the NOD1 receptor agonist. *Russian Immunological Journal*. 2019;22(2–2):891–93. <https://doi.org/10.31857/S102872210006572-4> (In Russ.).]
11. Tarique A.A., Logan J., Thomas E., et al. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. BioL.* 2015;53(5):676–88. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0012OC>.
12. Малышев И.Ю. Эпигенетические, посттранскрипционные и метаболические механизмы репрограммирования макрофагов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015;3:118–27. [Malyshev I.Y. Epigenetic, post-transcriptional and metabolic mechanisms of macrophage reprogramming. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2015;3:118–27 (In Russ.).]
13. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.
14. Мушина 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. [Musina L.A., Muslimov S.A., Lebedeva A.I., Volgareva E.A. Ultrastructure of macrophages detected during implantation of allogeneic biomaterial Alloplant. *Morphology*. 2006;129(1):53–56 (In Russ.).]
15. Gao J., Scheenstra M.R., van Dijk A., et al. A new and efficient culture method for porcine bone marrow-derived M1 and M2-polarized macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2018;200:7–15. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.04.002>.
16. Шиманский Ш.Л., Суворова И.А., Чиликин В.Н. и др. Роль фенотипа и пластичности макрофагов в развитии воспалительной реакции при экспериментальном гингивите у мышей разных генетических линий. *Dental Forum*. 2015;1:21–24. [Shimansky Sh.L., Suvorova I.A., Chilikin V.N. et al. The role of the phenotype and plasticity of macrophages in the development of an inflammatory reaction in experimental gingivitis in mice of different genetic lines. *Dental Forum*. 2015;1:21–24 (In Russ.).]
17. Schneider A., Wood H.N., Geden S., et al. Growth hormone-mediated reprogramming of macrophage transcriptome and effector functions. *Sci. Rep.* 2019;18(9)(1):19348. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56017-6>.
18. Румянцев В.А., Шиманский Ш.Л., Будашова Е.И. Влияние репрограммирования фенотипа макрофагов пародонта на их морфологические признаки. *Морфология*. 2019;155(2):244. [Rumiyansev V.A., Shimansky Sh.L., Budashova E.I. The influence of the programming of the phenotype of periodontal macrophages on their morphological characteristics. *Morphology*. 2019;155(2):244 (In Russ.).]
19. Румянцев В.А., Егорова Е.Н., Будашова Е.И. и др. Морфофункциональные изменения тканей пародонта при лечении больных хроническим пародонтитом с применением метода репрограммирования макрофагов. *Med.: Sci. Educat. (Ереван, Республика Армения)*. 2018;25:113–21. [Rumiyansev V.A., Egorova E.N., Budashova E.I. et al. Morphofunctional changes in periodontal tissues in the

*treatment of patients with chronic periodontitis using the method of reprogramming macrophages. Mad.: Sci. Educat. (Yerevan, Republic of Armenia). 2018;25:113–21 (In Russ.)].*

20. Румянцев В.А., Шиманский Ш.Л., Гаспарян М.Г. и др. Влияние биотехнологий репрограммирования макрофагов на инициированную воспалительную реакцию в пародонте мышей (Экспериментальное исследование). *Ватский медицинский вестник. 2019;2(62):56–60. [Rumyantsev V.A., Shimansky Sh.L., Gasparyan M.G. et al. The effect of macrophage reprogramming biotechnology on the initiated inflammatory response in periodontal mice (Experimental study). Yuatka Medical Bulletin. 2019;2(62):56–60 (In Russ.)].*

Поступила 09.10.21

Получены положительные рецензии 06.08.22

Принята в печать 10.08.22

Received 09.10.21

Positive reviews received 06.08.22

Accepted 10.08.22

**Вклад авторов:** В.А. Румянцев – концепция и дизайн исследования. А.Г. Денис, Ш.Л. Шиманский – сбор и обработка материала. А.В. Блинова – статистическая обработка данных. В.Г. Шестакова, С.А. Донсков – анализ и интерпретация данных. А.В. Блинова, В.А. Румянцев – написание и редактирование текста.

**Authors' contribution:** V.A. Rumyantsev – concept and design of the study. A.G. Denis, Sh.L. Shimansky – material collection and processing. A.V. Blinova – statistical data processing. Shestakova V.G., Donskov S.A. – data analysis and interpretation. A.V. Blinova, V.A. Rumyantsev – text writing and editing.

### Информация об авторах:

Румянцев Виталий Анатольевич – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пародонтологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава РФ. Адрес: 170100 Тверь, ул. Советская, 4; тел.: +7 (906) 554-35-07; e-mail: rumyantsev\_v@tvergma.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6045-3333>.

Денис Анна Григорьевна – врач челюстно-лицевой хирург Семейный центр «ООО Добрый доктор». Адрес: 170100 Тверь; тел.: +7 (904) 003-98-84; e-mail: anna.denis@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1348-430X>.

Шиманский Шалва Леванович – к.м.н., доцент кафедры пародонтологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава РФ. Адрес: 170100 Тверь, ул. Советская, 4; тел.: +7 (985) 222-41-99.

Шестакова Валерия Геннадьевна – д.биол.н., доцент, заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава РФ. Адрес: 170100 Тверь, ул. Советская, 4; тел.: +7 (910) 647-15-10, e-mail: shestakova-v-g@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1136-7396>.

Донсков Сергей Александрович – к. сельхоз.н., ассистент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава РФ. Адрес: 170100 Тверь, ул. Советская, 4; тел.: +7 (905) 127-21-37; e-mail: sadonskov@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-5534>.

Блинова Алиса Владимировна – аспирант кафедры пародонтологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава РФ. Адрес: 170100 Тверь, ул. Советская, 4; тел.: +7 (919) 051-60-59; e-mail: blinova-alisa@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-163X>.

### Information about the authors:

Rumyantsev Vitaly Anatolevich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Periodontology, Tver State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 4 Sovetskaya str., Tver, 170100; tel.: +7 (906) 554-35-07; e-mail: rumyantsev\_v@tvergma.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6045-3333>.

Denis Anna Grigorievna – MD, Oral and Maxillofacial Surgeon, Dobry Doctor LLC Family Center. Address: 170100 Tver; tel: +7 (904) 003-98-84; e-mail: anna.denis@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1348-430X>.

Shimansky Shalva Levanovich – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of Periodontology, Tver State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 4 Sovetskaya St., Tver, 170100; tel.: +7 (985) 222-41-99.

Shestakova Valeria Gennadievna – Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Histology, Embryology, and Cytology, Tver State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 4 Sovetskaya St., Tver, 170100; tel.: +7 (910) 647-15-10, e-mail: shestakova-v-g@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1136-7396>.

Donskov Sergey Alexandrovich - Candidate of Agricultural Sciences, Assistant of the Department of Histology, Embryology, and Cytology, Tver State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 4 Sovetskaya St., Tver, 170100; tel.: +7 (905) 127-21-37; e-mail: sadonskov@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-5534>.

Blinova Alisa Vladimirovna – Postgraduate student of Periodontology Department, Tver State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 4 Sovetskaya St., Tver, 170100; tel.: +7 (919) 051-60-59; e-mail: blinova-alisa@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-163X>.