

Экспрессия VEGFR-3 в лимфатических сосудах собственной пластинки десны человека с учетом возраста и воспаления**Е.М. Сперанская^{1✉}, Н.Н. Голубцова¹, С.П. Деревянченко², Л.Н. Денисенко²**¹Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова, Чебоксары, Россия²Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Активация фактора роста эндотелия сосудов VEGFR-3 приводит к пролиферации, дифференцировке и миграции лимфатических эндотелиальных клеток. Роль данного фактора в тканях пародонта в норме и при воспалении требует более подробного изучения. Цель данного исследования: изучить распределение и экспрессию VEGFR-3 в лимфатических сосудах собственной пластинки десны при воспалении и применении диодного лазера у людей молодого и зрелого возраста. Срезы биопсийного материала десны человека изучали иммуногистохимическим методом. В результате исследования было установлено, что у пациентов с условно здоровым пародонтом число лимфатических сосудов зависит от возраста и отличается у молодых пациентов по сравнению с пациентами зрелого возраста в 1,2 раза. Одновременно было установлено, что в контрольных группах подавляющее большинство сосудов не содержит VEGFR-3 или имеет слабую экспрессию рецептора независимо от возраста. Тенденция к VEGFR-3-опосредованному увеличению числа лимфатических сосудов при воспалении наблюдается только в возрасте от 41 до 60 лет, однако интенсивность экспрессии рецептора VEGF 3-го типа при хроническом воспалении десны смещается в сторону увеличения доли сосудов со средней и сильной экспрессией VEGFR-3 в обеих группах. В результате исследования сделаны выводы, что тенденция к изменению числа VEGFR-3-положительных сосудов наблюдается только в воспаленной ткани десны у пациентов после 41 года. Диодный лазер оказывает стимулирующее влияние на VEGFR-3-опосредованную сосудистую циркуляцию у пациентов молодого возраста, в то время как у пациентов зрелого возраста терапия диодным лазером приводит к увеличению доли лимфатических сосудов со средней и сильной экспрессией изученного рецептора, но практически не влияет на число выявляемых сосудов.

Ключевые слова: лимфатические сосуды, VEGFR-3, эндотелий, диодный лазер, пародонтит

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2023-20-2-88-91>**Expression of VEGFR-3 in the lymphatic vessels of the human gum lamina proper within the age and inflammation****E.M. Speranskaya^{1✉}, N.N. Golubtsova¹, S.P. Derevyanchenko², L.N. Denisenko²**¹Chuvash State University named after I. N. Ulyanov, Cheboksary, Russia²Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. Activation of vascular endothelial growth factor VEGFR-3 leads to proliferation, differentiation and migration of lymphatic endothelial cells. The role of this factor in periodontal tissues in normal and inflammatory conditions requires extensive study. The purpose of this study: to study the distribution and expression of VEGFR-3 in the lymphatic vessels of the gum lamina proper during inflammation and the use of a diode laser in young and mature people. Slices of human gum biopsy material were studied by immunohistochemical method. As a result of the research, it was found that in the patients with conditionally healthy periodontal tissues, the number of lymphatic vessels depends on the age and differs in young patients compared to mature patients by 1.2 times. Simultaneously, it was found that in the control groups, the majority of vessels do not contain VEGFR-3 or have weak receptor expression regardless of age. The tendency to VEGFR-3-mediated increasing of the number of lymphatic vessels during the inflammation is observed only at the age of 41 to 60, however, the intensity of the expression of the VEGF type 3 receptor in chronic gingival inflammation shifts towards the increasing of the vessels with medium and strong VEGFR-3 expression in both groups. As a result of the study, it was found that the tendency to change the number of VEGFR-3-positive vessels is observed only in inflamed gum tissue in patients after 41. Diode laser has a stimulating effect on VEGFR-3-mediated vascular circulation in young patients, while in mature patients, diode laser therapy leads to increase the part of lymphatic vessels with medium and strong expression of the studied receptor, but practically does not affect on the number of detected vessels.

Keywords: lymphatic vessels, VEGFR-3, endothelium, diode laser, periodontitis

Лимфатическая сосудистая сеть имеет решающее значение в регуляции любой воспалительной реакции. Она влияет на дренирование внесосудистой жидкости,

количество медиаторов воспаления и лейкоцитов [1, 2]. В регуляции нормальных и патологических ангиогенных процессов задействовано семейство VEGF.

Считается, что VEGFR-1 и VEGFR-2 экспрессируются преимущественно на эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, а VEGFR-3 преимущественно на лимфатических эндотелиальных клетках [3]. Также известно, что VEGFR-3 может выявляться в эндотелии кровеносных сосудов, преимущественно в фенестрированном эндотелии. Есть мнение, что около 30 % капилляров десны относится к фенестрированным [3, 4]. Активация VEGFR-3 приводит к пролиферации, дифференцировке и миграции лимфатических эндотелиоцитов [4]. Однако роль данного фактора в тканях пародонта в норме и при воспалении до конца не изучена [5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить распределение и экспрессию VEGFR-3 в лимфатических сосудах собственной пластинки десны при воспалении и применении диодного лазера у людей молодого и зрелого возраста.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служил биопсийный материал десны человека $0,3 \times 0,3$ см, полученный по пародонтологическим, хирургическим, ортопедическим и ортодонтическим показаниям. Пациенты были распределены на 2 группы.

В группу I (группа молодого возраста) были включены пациенты 20–40 лет. Данная группа, в свою очередь, была разделена на следующие подгруппы: контрольная группа 1 – пациенты с клинически здоровым пародонтом; группа с воспалением пародонта 1 – пациенты с хроническим генерализованным пародонтитом легкой/средней степени тяжести; группа после лазеротерапии 1 – пациенты с хроническим генерализованным пародонтитом после терапии диодным лазером.

Во II группу (группа среднего возраста) были включены пациенты от 41 до 60 лет и также разделены на подгруппы: контрольная группа 2 – пациенты с клинически здоровым пародонтом; группа с воспалением пародонта 2 – пациенты с хроническим генерализованным пародонтитом легкой/средней степени тяжести; группа после лазеротерапии 2 – пациенты с хроническим генерализованным пародонтитом после терапии диодным лазером.

Для обнаружения VEGFR-3 – положительных эндотелиоцитов в качестве первых антител использовали кроличьи антитела против антигена VEGFR-3 (Thermo Scientific, США). Продукт реакции окрашивался в коричневый цвет. Срезы докрашивали гематоксилином.

Количественную оценку результатов исследования проводили с использованием светового микроскопа Nikon Eclipse E200 с цифровой камерой Nikon DS-Fi3, персонального компьютера с операционной системой Windows 10 и программы SigmaScanPro 5.0 (SPSS Inc., США) [6]. В полученных снимках вычисляли площадь сфотографированных участков

и подсчитывали число иммунопозитивных сосудов на 1 мм^2 . Также оценивали интенсивность экспрессии VEGFR-3 в эндотелиоцитах по следующей шкале: 0 – без окрашивания, 1 – слабое окрашивание (светло-коричневый цвет), 2 – средняя интенсивность окрашивания (коричневый цвет), 3 – сильное окрашивание (темно-коричневый цвет) [7].

Ввод данных и описательный анализ выполняли с использованием статистической программы Statistical10 и Microsoft Exel 2010. В каждой группе рассчитывали средние арифметические величины (M) и их стандартные ошибки (m). Достоверность влияния возраста, воспаления и лазера на исследуемые параметры десны оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA-тест), метода линейной регрессии, непараметрического рангового корреляционного анализа Спирмена [8].

Проведение исследования одобрено этическим комитетом медицинского факультета Чувашского государственного университета имени И. Н. Ульянова (протокол № 20/06 от 16.06.2020 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Лимфатические сосуды были выявлены в собственной пластинке десны во всех исследуемых группах. VEGFR-3-положительно окрашенные эндотелиоциты имели коричневый цвет, но отличались интенсивностью окрашивания.

В контрольной группе 1 (20–40 лет) и контрольной группе 2 (41–60 лет) без признаков воспаления выявлялось (2091 ± 230) и ($1809,15 \pm 125,55$) лимфатических сосудов на 1 мм^2 ткани собственной пластинки десны с положительным окрашиванием на VEGFR-3 соответственно. При этом большинство сосудов характеризовались слабой интенсивностью экспрессии VEGFR-3 независимо от возраста (рис.).

Образцы десны пациентов из группы с воспалением пародонта 1 (20–40 лет) не отличались по параметру содержания VEGFR-3-положительных сосудов от контрольной группы 1 (20–40 лет) без воспаления. Можно отметить, что сосуды были распределены равномерно по собственной пластинке, но имели разный диаметр. При этом уменьшалось число сосудов с неокрашенным эндотелием и увеличивалось число лимфатических сосудов со средней экспрессией VEGFR-3 (рис.).

В группе после лазеротерапии 1 было выявлено ($2800,66 \pm 329,51$) лимфатических сосудов на 1 мм^2 ткани десны положительно окрашенных на VEGFR-3, что в 1,4 раза больше, чем в группе с воспалением пародонта 1 (20–40 лет). Таким образом, мы наблюдали уменьшение числа VEGFR-3-положительных сосудов после терапии диодным лазером.

В группе с воспалением пародонта 2 (41–60 лет) число сосудов с положительным окрашиванием на

VEGFR-3 в 1,2 раза превышало значения контрольной группы 2 (41–60 лет). Однако, по сравнению с молодыми пациентами, в срезах десны в равной степени были представлены лимфатические сосуды со слабой, средней и сильной интенсивностью экспрессии VEGFR-3 (рис.).

В образцах десны пациентов группы после лазеротерапии 2 наблюдалось уменьшение количества лимфатических сосудов в собственной пластинке. При подсчете было выявлено ($1901,5 \pm 156,83$) лимфатических сосудов на 1 мм^2 соединительнотканного слоя десны. Таким образом, эффект от воздействия диодного лазера на ткани десны отличался у пациентов молодого и зрелого возраста.

При проведении однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA-тест) методом парных сравнений внутри I группы пациентов молодого возраста выявлено статистически значимое ($p = 0,018$) различие между имеющимися подгруппами. Так, группа после лазеротерапии 1 отличалась от контрольной группы 1 на 34 %. Различие между группой с воспалением пародонта 1 и контрольной группой 1 составила 3,6 %.

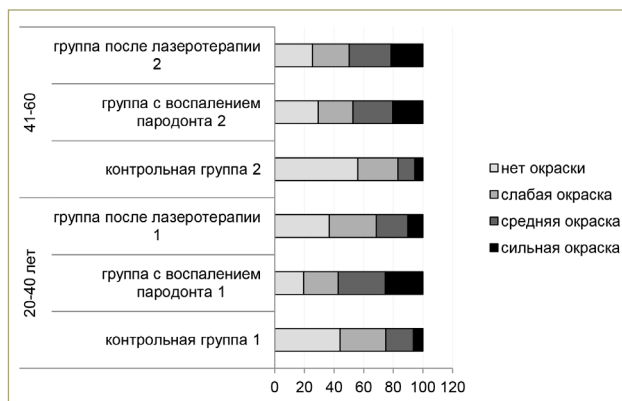


Рис. Интенсивность экспрессии VEGFR-3 в эндотелиоцитах лимфатических сосудов собственной пластинки десны человека у пациентов в возрасте от 20 до 40 лет и пациентов в возрасте от 41 до 60 лет; $p < 0,05$ – дисперсионный анализ. По оси абсцисс – интенсивность экспрессии VEGFR-3 в усл.ед., по оси ординат – распределение лимфатических сосудов в соответствии с интенсивностью экспрессии VEGFR-3

Во II исследуемой группе (40–60 лет) при проведении однофакторного дисперсионного анализа статистически достоверных различий не выявлено ($p = 2,47$), но при графическом изображении совокупности переменных исследуемых подгрупп определяется увеличение числа лимфатических сосудов при хроническом пародонтите на уровне тенденции.

Корреляционный анализ выявил умеренную положительную взаимосвязь между увеличением доли лимфатических сосудов с сильной экспрессией VEGFR-3

после лазеротерапии по сравнению с воспаленным пародонтом в группе пациентов молодого возраста (группа I) ($r = +0,4$; $p < 0,05$). Также установлена слабая положительная взаимосвязь между возрастом и увеличением доли лимфатических сосудов с сильной экспрессией VEGFR-3 ($r = +0,19$; $p < 0,05$) между группой с воспалением пародонта 1 (20–40 лет) и группой с воспалением пародонта 2 (41–60 лет). Во II группе исследования (41–60 лет) установлена слабая корреляционная взаимосвязь между увеличением доли лимфатических сосудов с сильной экспрессией VEGFR-3 после лазеротерапии (группа после лазеротерапии 2) по сравнению с группой с воспаленным пародонтом 2 ($r = +0,14$; $p < 0,05$). Таким образом, по результатам исследования все параметры (возраст, хроническое воспаление пародонта, воздействие диодного лазерного излучения) оказывают влияние на интенсивность экспрессии VEGFR-3 в лимфатических сосудах собственной пластинки десны ($p < 0,05$).

Терапевтическое действие диодного лазера, подавляющего воспалительный процесс в тканях пародонта [9] коррелирует со статистически достоверным увеличением числа лимфатических сосудов у пациентов от 20 до 40 лет, что, учитывая благоприятные эффекты активации лимфатических сосудов при воспалении, является морфологической основой увеличения оттока тканевой жидкости и уменьшения отека [1]. Кроме того, VEGF способствует хемотаксису макрофагов и миграции фибробластов [10], которые необходимы для реализации местной иммуно-воспалительной реакции и инициации регенерации соединительнотканых структур пародонта, восстановления микроциркуляции, способствующего нормализации эпителиально-мезенхимального взаимодействия в десне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Содержание лимфатических сосудов с положительным окрашиванием на VEGFR-3 в соединительнотканном слое здоровой десны имеет отличия в возрастном аспекте. Тенденция к изменению числа VEGFR-3-положительных сосудов наблюдается только в воспаленной ткани десны у пациентов после 41 года. Диодный лазер оказывает стимулирующее влияние на VEGFR-3-опосредованную сосудистую циркуляцию у пациентов молодого возраста, в то время как у пациентов зрелого возраста терапия диодным лазером приводит к увеличению доли лимфатических сосудов со средней и сильной экспрессией изученного рецептора, но практически не влияет на число выявляемых сосудов.

REFERENCES

1. Chakraborty A., Scogin C.K., Rizwan K. et al. Characterizing Lymphangiogenesis and Concurrent Inflammation in Adipose Tissue in Response to VEGF-D. *Frontiers in physiology*. 2020;11:363. URL: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00363>

2. Schwager S., Detmar M. Inflammation and Lymphatic Function. *Frontiers in immunology*. 2019;10: 308. URL <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00308>.
3. Heinolainen K., Karaman S., D'Amico G. et al. VEGFR3 Modulates Vascular Permeability by Controlling VEGF/VEGFR2 Signaling. *Circulation research*. 2017;120(9): 1414–1425. URL: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310477>.
4. Dieterich L.C., Ducoli L., Shin J.W. et al. Distinct transcriptional responses of lymphatic endothelial cells to VEGFR-3 and VEGFR-2 stimulation. *Scientific data*. 2017;4: 170106. URL: <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.106>.
5. Vasconcelos R.C., Costa A., Freitas R. et al. Immunoexpression of HIF-1 α and VEGF in Periodontal Disease and Healthy Gingival Tissues. *Brazilian dental journal*. 2016; 27(2):117–122.
6. Gunin A.G., Petrov V.V., Golubtzova N.N. et al. Age-related changes in angiogenesis in human dermis. *Experimental gerontology*. 2014;55:143–151. URL: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.04.010>.
7. Jalayer Naderi N., Semyari H., Hemmati R. The Effect of Smoking on Mast Cells Density and Angiogenesis in Chronic Periodontitis. *Iranian journal of pathology*. 2017;12(4):384–391.
8. Emecen-Huja P., Eubank T. D., Shapiro V., et al. Peri-implant versus periodontal wound healing. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40(8):816–824. URL: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12127>.
9. Choung H.W., Lee S.H., Ham A.R. et al. Effectiveness of Low-Level Laser Therapy with a 915 Nm Wavelength Diode Laser on the Healing of Intraoral Mucosal Wound: An Animal Study and a Double-Blind Randomized Clinical Trial. *Medicina (Kaunas)*. 2019;24;55(8):405. doi: 10.3390/medicina55080405.
10. Pitzurra L., Jansen D.C., de Vries T.J. et al. Effects of L-PRF and A-PRF+ on periodontal fibroblasts in in vitro wound healing experiments. *Journal of periodontal research*. 2020;55(2):287–295.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Екатерина Михайловна Сперанская – старший преподаватель кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины, Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия; katerina_dumspirospero@mail.ru

Наталья Николаевна Голубцова – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической морфологии и судебной медицины, Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия; golubnata@list.ru

Светлана Павловна Деревянченко – кандидат медицинских наук, доцент кафедры пропедевтики стоматологических заболеваний Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; svetka62@yandex.ru

Лариса Николаевна Денисенко – кандидат медицинских наук, доцент кафедры пропедевтики стоматологических заболеваний, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; larimari@list.ru

Статья поступила в редакцию 11.03.2023; одобрена после рецензирования 14.04.2023; принята к публикации 12.05.2023.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Ekaterina M. Speranskaya – Senior Lecturer of the Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia; katerina_dumspirospero@mail.ru

Natalia N. Golubtsova – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia; golubnata@list.ru

Svetlana P. Derevyanchenko – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Propaedeutics of Dental Diseases Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; svetka62@yandex.ru

Larisa N. Denisenko – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Propaedeutics of Dental Diseases, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; larimari@list.ru

The article was submitted 11.03.2023; approved after reviewing 14.04.2023; accepted for publication 12.05.2023.