



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.6.2.001>
УДК 616.314.17-008.1-08:615.27



Казеко Л.А.¹, Захарова В.А.², Бенеш Ю.Д.³ ✉

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, пос. Лесной Минского р-на, Беларусь

³ 11-я городская клиническая стоматологическая поликлиника, Минск, Беларусь

Особенности экспрессии циклооксигеназы-2 при различных формах патологии периодонта

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: разработка цели, концепции и дизайна исследования, набор пациентов в группы, их обследование и лечение, написание текста и утверждение финальной версии рукописи – Казеко Л.А.; согласование концепции и дизайна исследования, морфометрический анализ гистологических изображений, статистическая обработка, обобщение данных, критический анализ и корректировка текста рукописи, формата представления полученных результатов – Захарова В.А.; поиск публикаций по теме, статистическая обработка, написание текста рукописи – Бенеш Ю.Д.

Подана: 04.05.2022

Принята: 16.05.2022

Контакты: julia.benesh@gmail.com

Резюме

Исследование особенностей экспрессии циклооксигеназы-2 (COX2) важно для правильного и своевременного выбора патогенетически обоснованной терапии заболеваний периодонта.

Цель. Установить особенности экспрессии COX2 в биопсийном материале десен пациентов с различным характером течения периодонтита на этапе манифестации заболевания.

Материалы и методы. Исследован биопсийный материал десен 65 пациентов с различным характером течения периодонтита, окрашенный с использованием моноклональных антител к COX2. Морфометрический и статистический анализ выполнен с использованием Aperio ImageScope v12.4.0.5043, Statistica 10.0, MedCalc, $p < 0,05$.

Результаты. Согласно данным визуальной оценки и морфометрического анализа в группе контроля наблюдалась наименьшая эпителиальная и стромальная экспрессия COX2 со статистически значимым ростом параметров позитивности и интенсивности как эпителиальной, так и стромальной экспрессии COX2 в направлении быстропрогрессирующего периодонтита и хронических форм с наибольшими значениями параметров экспрессии при хроническом простом периодонтите. При этом хронические формы периодонтита не имели статистически значимых различий по большинству параметров стромальной экспрессии COX2.

Закключение. Проведенный анализ особенностей экспрессии COX2 в биопсийном материале десен показал значимо более выраженную экспрессию данного фермента при всех формах периодонтита вне зависимости от характера их течения по сравнению с группой контроля. Полученные результаты подтверждают важную роль COX2 в патогенезе воспаления периодонта без особой специфики в отношении исследованных форм периодонтита и обосновывают возможность адъювантного применения

СОХ-ингибиторов (в том числе СОХ2-селективных) в комплексном нехирургическом лечении пациентов с данной патологией уже на этапе манифестации заболевания.

Ключевые слова: циклооксигеназа-2, периодонтит, иммуногистохимия, экспрессия

Kazeko L.¹, Zakharava V.², Benesh J.³ ✉

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Lesnoy, Minsk District, Belarus

³ 11th City Clinical Dental Clinic, Minsk, Belarus

The Features of Cyclooxygenase-2 Expression in Different Types of Periodontal Pathology

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: development of the goal, concept and design of the study, recruitment of patients into groups, their examination and treatment, writing, approval of the final version – L. Kazeko; agreement on the concept and design of the study, morphometric analysis of histological images, statistical processing, generalization of data, critical analysis and correction of the text, format for presenting the results – V. Zakharava; search for publications on the topic, statistical processing, writing – J. Benesh.

Submitted: 04.05.2022

Accepted: 16.05.2022

Contacts: julia.benesh@gmail.com

Abstract

The study of the features of the expression of cyclooxygenase-2 (COX2) is important for the correct, timely and pathogenetic treatment of periodontitis.

Purpose. To determine the features of COX2 expression in gingival biopsies of patients with different types of periodontitis at the stage of disease manifestation.

Materials and methods. The gingival biopsy material of 65 patients with different types of periodontitis stained with monoclonal antibodies to COX2, was studied. Morphometric and statistical analysis was performed using AperioImageScope v12.4.0.5043, Statistica 10.0, MedCalc, $p < 0.05$.

Results. According to the results of visual estimation and morphometric analysis, the control group had the lowest epithelial and stromal expression of COX2 with a statistically significant increase in the parameters of positivity and intensity of both epithelial and stromal expression of COX2 in aggressive periodontitis and chronic periodontitis with the highest values of expression parameters in chronic simplex periodontitis. At the same time, chronic types of periodontitis didn't have statistically significant differences in most parameters of stromal expression of COX2.

Conclusion. The analysis of the features of the expression of COX2 in the gingival biopsy material showed a significantly more pronounced expression of this enzyme in all forms of periodontitis, regardless of the nature of their course, compared with the control group. The obtained results confirm the important role of COX2 in the pathogenesis of periodontal inflammation without specificity in relation to the studied forms of periodontitis and substantiates the possibility of adjuvant use of COX inhibitors (including COX2-selective) in the complex non-surgical treatment of patients with periodontitis at the stage of disease manifestation.

Keywords: periodontitis, cyclooxygenase-2, immunohistochemistry, expression



■ ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные прогрессирующие заболевания тканей периодонта – самая значимая причина потери зубов у взрослых, резко снижающая качество жизни данной категории пациентов и требующая значительных финансовых затрат на их лечение. Патогенез периодонтита, с одной стороны, является универсальным [1]. Тем не менее, он представляет собой сложное взаимодействие средовых, этиологических, клинических факторов риска, молекулярно-генетических изменений, которые вносят дифференцированный вклад в общую многофакторную модель заболевания, что и обуславливает различия в возрасте манифестации, тяжести течения заболевания и скорости его прогрессирования [2]. В основе патогенеза воспаления периодонта лежит локальная воспалительная реакция с выделением широкого спектра цитокинов, синтез многих из которых опосредован действием циклооксигеназы-2 (COX2). Рядом исследователей на экспериментальной модели периодонтита представлено повышение экспрессии COX2 в собственной пластинке десны субэпителиально и наличие деструкции костной ткани альвеолярного отростка челюсти. При этом в группе с селективным ингибированием COX2 степень выраженности воспаления и резорбции кости была значимо ниже [3]. Данные эффекты могут быть опосредованы различными цитокинами. Так, COX2-опосредованная стимуляция выработки остеобластами простагландинов (в частности PGE2) может приводить как к активации остеогенеза при механическом воздействии и заживлении переломов, так и PGE2-опосредованной резорбции кости на фоне воспалительных заболеваний, в том числе периодонта [4]. Методами иммуоферментного и радиоиммунного анализа показано повышение уровней PGE2 и PGF2-альфа в ткани десны у пациентов с хроническими формами периодонтита и наличие клинического эффекта со снижением уровней данных цитокинов на фоне применения селективных COX2- и неселективных COX1/COX2-ингибиторов [5]. COX2-индуцированное увеличение экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в ткани десны в эксперименте купировалось применением COX2-ингибиторов со снижением уровней экспрессии VEGF и уменьшением степени деструкции костной ткани альвеолярного отростка [6]. Также использование селективных и неселективных COX-ингибиторов при индуцировании периодонтита в эксперименте характеризовалось более низкими параметрами утраты прикрепления, альвеолярной резорбции со снижением уровней экспрессии COX2 в периодонтальной связке и альвеолярном отростке и PGE2 в ткани десны [7, 8]. Тем не менее, вопрос применения нестероидных противовоспалительных препаратов в периодонтологии не решен, поскольку, несмотря на положительный клинический эффект, результаты адъювантного использования селективных и неселективных COX-ингибиторов в отношении репаративного остеогенеза весьма противоречивы [9, 10].

Таким образом, исследование уровней экспрессии COX2 при периодонтите в зависимости от тяжести и скорости его прогрессирования открывает новые перспективы в персонализации терапии данной категории пациентов.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить особенности экспрессии циклооксигеназы-2 в биопсийном материале десен пациентов с различным характером течения периодонтита на этапе манифестации заболевания.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические данные. Клинико-инструментальное обследование и лечение 65 пациентов с различным характером течения периодонтита: быстропрогрессирующим (БПП, Grade C, n=23), хроническим простым (ХПП, Grade B, n=8) и хроническим сложным (при наличии окклюзионной травмы) (ХСП, Grade B, n=34) выполнено на 1-й кафедре терапевтической стоматологии УО «Белорусский государственный медицинский университет», с получением у каждого из пациентов информированного согласия. В процессе кюретажа периодонтальных карманов забирались биопсийный материал десен, который и был объектом данного исследования. Критериями включения в исследование явились клинико-рентгенологические признаки патологии периодонта и возраст пациентов для быстропрогрессирующего и хронического течения периодонтита 18–35 и 36–60 лет соответственно. Группу контроля составили пациенты с предимплантационными биопсиями (n=6).

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ). Гистологические срезы с парафиновых блоков толщиной 2,5 мкм депарафинировались в ксилоле и обезживались в спиртах возрастающей концентрации с ИГХ-окрашиванием ткани десен моноклональными антителами к COX2.

Морфометрический анализ. Сканирование препаратов выполнялось с применением цифрового слайд-сканера MoticEasyScan. Программный анализ изображений включал выделение 6 случайных непересекающихся полей зрения (цифровое увеличение $\times 20$), анализ ИГХ-окрашивания в эпителиальном и стромальном компонентах десны (по 3 поля зрения) в Aperio ImageScope v12.4.0.5043 и расчет следующих параметров экспрессии COX2: позитивности (Positivity), доли пикселей с высокой и умеренной интенсивностью (Nsr+p); индекса интенсивности в иммунопозитивных участках (index), общего индекса интенсивности (INDEX). Результат программной оценки показателей позитивности и доли пикселей с высокой и умеренной экспрессией имел прямую взаимосвязь, а интенсивности экспрессии – обратную взаимосвязь с данными визуальной оценки.

Статистический анализ. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0 с вычислением медианы (Me) и интерквартильного (IQR) интервала. Сравнение независимых выборок осуществляли с использованием дисперсионного анализа непараметрических данных ANOVA и определением критерия Манна – Уитни (U-критерий). С целью решения задачи классификации периодонтита выполнен ROC-анализ с определением пороговых значений и их операционных характеристик. Информативность параметров экспрессии оценивали по показателю AUC (площади под ROC-кривой) в соответствии со шкалой: 0,9–1,0 – наивысшая, 0,8–0,9 – хорошая, 0,7–0,8 – приемлемая, 0,6–0,7 – слабая, 0,5–0,6 – крайне слабая. Уровень статистической значимости $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значимых различий между исследуемыми группами пациентов по гистологическим признакам, глубине периодонтальных карманов, утере прикрепления LA «I» и LA «II», рецессии десны, поражению фуркации I–II степени, подвижности зубов I–II степени не выявлено, за исключением данных панорамной и/или компьютерной томографии. Так, в группах быстропрогрессирующего и хронического сложного периодонтита статистически значимо чаще выявлялась вертикальная резорбция костной



ткани I-II степени, а в группе хронического простого периодонтита преобладала горизонтальная резорбция I-II степени ($p \leq 0,002$ и $p \leq 0,024$ соответственно).

ИГХ-окрашивание характеризовалось цитоплазматической экспрессией COX2 в эпителии десны, фибробластах, эндотелии с выраженным преобладанием экспрессии в клетках воспалительного инфильтрата. Согласно данным визуальной оценки и морфометрического анализа, в группе контроля наблюдалась наименьшая эпителиальная и стромальная экспрессия COX2 со статистически значимым ростом параметров в группах пациентов с периодонтитом (табл. 1, рис. 1, 2).

Таблица 1
Параметры экспрессии COX2 в биопсийном материале десен пациентов с различными формами патологии периодонта
Table 1
The COX2 expression in the gingival biopsy material of patients with different types of periodontal pathology

Параметры Me [IQR]	Контроль, эпителиальная/стромальная	БПП, эпителиальная/стромальная	ХПП, эпителиальная/стромальная	ХСП, эпителиальная/стромальная
Positivity	91,0 [74,0; 970,0] 23,5 [15,0; 36,0]	99,0 [95,0; 100,0] 43,5 [29,5; 58,0]	100,0 [99,0; 100,0] 52,0 [34,0; 71,0]	98,0 [93,0; 100,0] 50,0 [31,0; 66,0]
Nsr+p	37,4 [8,1; 73,0] 12,1 [5,4; 19,4]	95,7 [82,2; 98,5] 25,3 [16,5; 37,3]	98,9 [96,9; 99,5] 31,5 [22,7; 55,6]	96,0 [84,6; 98,9] 33,0 [19,4; 47,1]
index	178 [158; 194] 167 [161; 177]	137 [124; 150] 149 [138; 160]	119 [107; 134] 142 [122; 153]	126 [108; 142] 145 [133; 157]
INDEX	178 [157; 193] 181 [174; 187]	136 [124; 150] 164 [151; 174]	119 [107; 134] 157 [124; 171]	126 [109; 142] 155 [142; 168]

Таблица 2
Сравнение групп по параметрам экспрессии COX2 в биопсийном материале десен пациентов с различными формами патологии периодонта
Table 2
Comparison of the parameters of COX2 expression in gingival biopsies from patients with different types of periodontal pathology

Positivity эпителиальная/стромальная	Nsr+p эпителиальная/стромальная	index эпителиальная/стромальная	INDEX эпителиальная/стромальная
БПП (Grade C) – ХПП (Grade B)			
$U_e=15\ 482$ $p_e<0,0001^{***}$ $U_s=15\ 841$ $p_s=0,0002^{**}$	$U_e=12\ 446$ $p_e<0,0001^{***}$ $U_s=14\ 952$ $p_s<0,0001^{***}$	$U_e=13\ 957$ $p_e<0,0001^{***}$ $U_s=14\ 740$ $p_s<0,0001^{***}$	$U_e=13\ 897$ $p_e<0,0001^{***}$ $U_s=16\ 042$ $p_s<0,0001^{***}$
БПП (Grade C) – ХСП (Grade B)			
$U_e=87\ 499$ $p_e=0,004^*$ $U_s=15\ 841$ $p_s=0,003^*$	$U_e=91\ 785$ $p_e=0,101$ $U_s=77\ 782$ $p_s<0,0001^{***}$	$U_e=74\ 492$ $p_e<0,0001^{***}$ $U_s=81\ 704$ $p_s=0,001^{**}$	$U_e=75\ 122$ $p_e<0,0001^{***}$ $U_s=71\ 815$ $p_s<0,0001^{***}$
ХПП (Grade B) – ХСП (Grade B)			
$U_e=18\ 821$ $p_e<0,0001^{***}$ $U_s=25\ 347$ $p_s=0,054$	$U_e=20\ 681$ $p_e=0,0001^{***}$ $U_s=25\ 500$ $p_s=0,066$	$U_e=29\ 302$ $p_e=0,013^*$ $U_s=23\ 900$ $p_s=0,006^*$	$U_e=29\ 067$ $p_e=0,009^*$ $U_s=27\ 765$ $p_s=0,599$

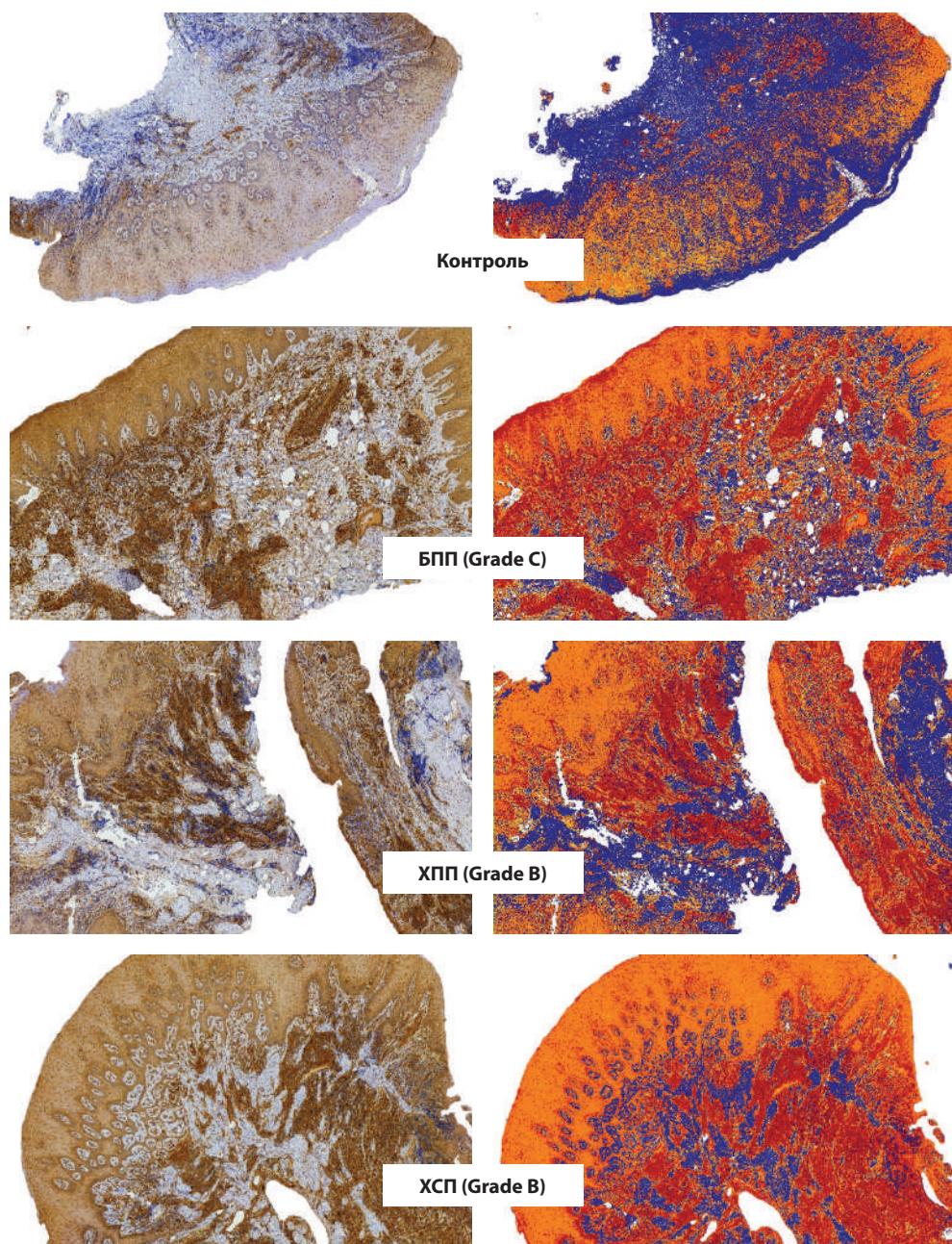


Рис. 1. Характер экспрессии COX2 в биопсийном материале десен. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к COX2, $\times 50$, и результат работы алгоритма «positive pixel count» программы Apero ImageScope

Fig. 1. The features of COX2 expression in the gingival biopsy material. Immunohistochemical staining with antibodies to COX2, $\times 50$, and the result of Apero ImageScope program analysis using "positive pixel count" algorithm

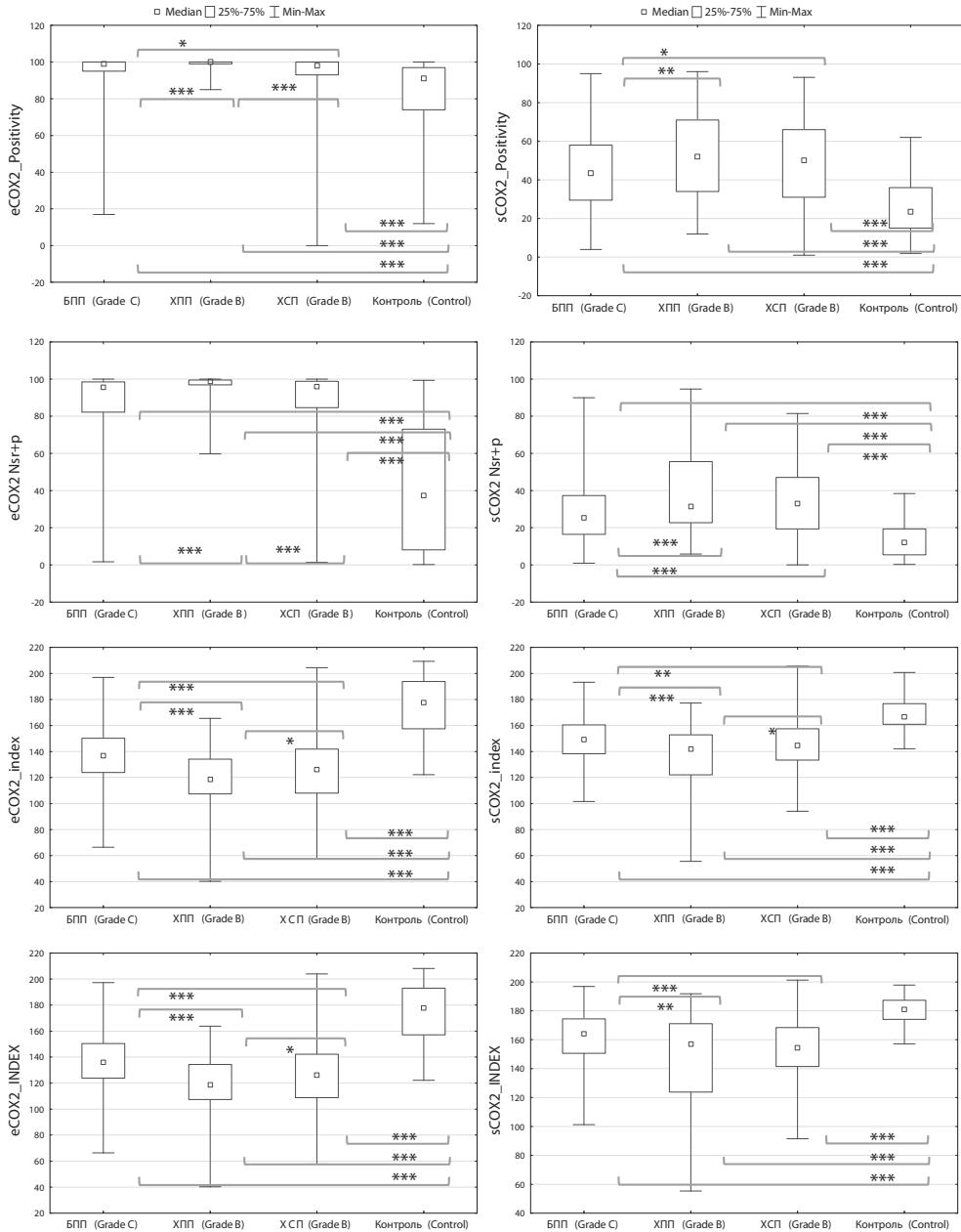


Рис. 2. Характер эпителиальной (слева) и стромальной (справа) экспрессии COX2 в биопсийном материале десен в группах пациентов с различными формами патологии периодонта
Fig. 2. The features of the epithelial (left) and stromal (right) COX2 expression in the gingival biopsy material in groups of patients with different types of periodontal pathology

Примечания: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

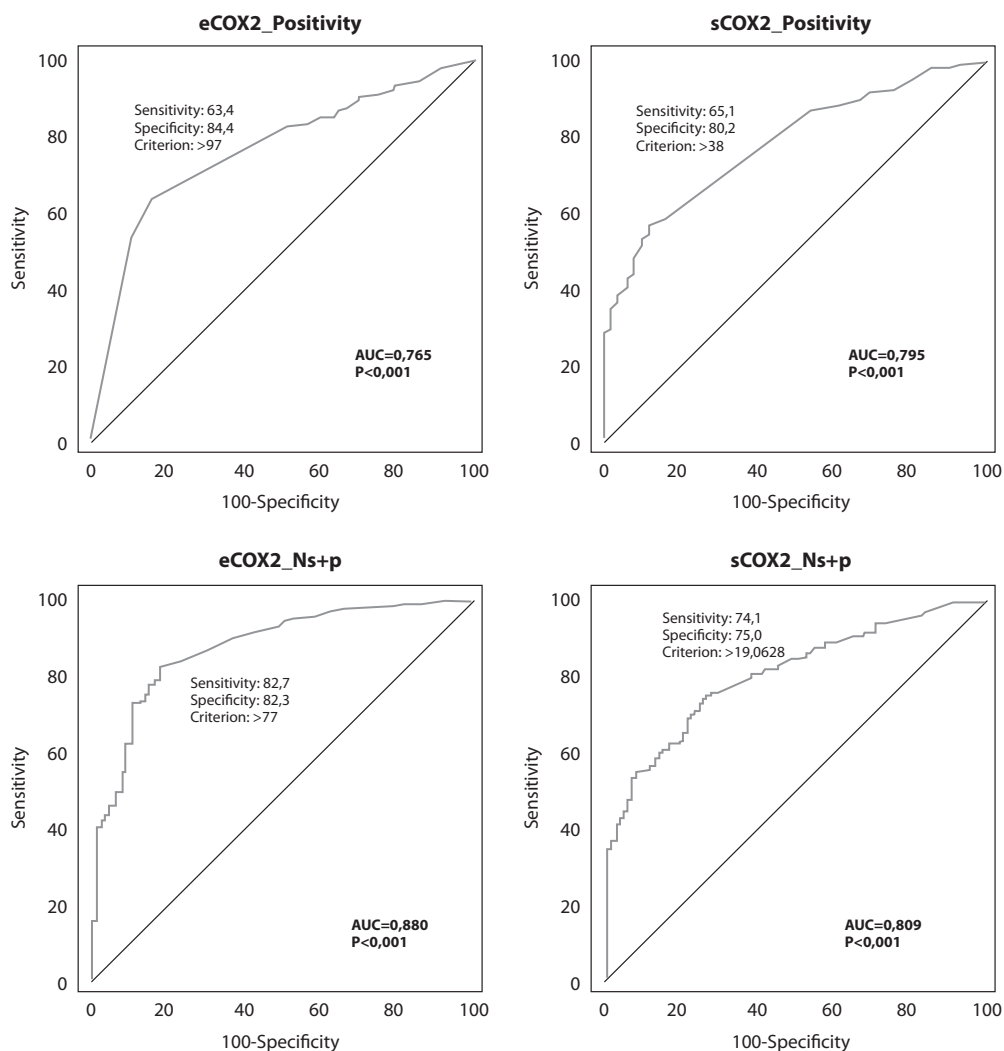


Рис. 3. ROC-анализ параметров экспрессии COX2 в биопсийном материале десен в группах пациентов с различным характером течения периодонтита и группе контроля
Fig. 3. ROC-analysis of parameters of COX2 expression in the gingival biopsy material in groups of patients with different types of periodontitis and control group

ROC-анализ подтвердил хорошую и приемлемую информативность параметров экспрессии COX2 в разграничении различных форм периодонтита и нормальной слизистой десны предимплантационных биопсий (рис. 3).

Парное сравнение групп периодонтита выявило статистически значимое увеличение позитивности и интенсивности как эпителиальной, так и стромальной экспрессии COX2 в направлении от быстро прогрессирующего периодонтита к хроническим формам с наибольшими значениями параметров экспрессии при хроническом



Таблица 3

Информативность показателей экспрессии COX2 в дифференциальной диагностике
быстропрогрессирующего и хронического простого/сложного периодонтитов
Table 3

Informativeness of the parameters of COX2 expression in the differential diagnosis of aggressive
(Grade C) and chronic simple/chronic complex (Grade B) periodontitis

Параметр экспрес- сии	БПП-ХПП		БПП-ХСП	
	Пороговое значение [AUC, p]	ДЧ/ДС, %	Пороговое значение [AUC, p]	ДЧ/ДС, %
Эпителиальная экспрессия COX2				
Positivity	≤97,0 [0,67, p<0,001]*	34,0/91,4	>97,0 [0,56, p=0,004]	66,0/45,1
Nsr+p	≤96,9 [0,74, p<0,001]**	60,9/75,0	≤98,9 [0,53, p=0,099]	83,7/24,6
index	>124 [0,71, p<0,001]**	75,0/60,9	>127 [0,62, p<0,001]*	70,7/52,0
INDEX	>123 [0,71, p<0,001]**	75,8/60,2	>127 [0,62, p<0,001]*	70,7/51,8
Стромальная экспрессия COX2				
Positivity	≤49,0 [0,62, p<0,001]*	64,4/55,4	≤49,0 [0,56, p=0,003]	64,4/51,4
Nsr+p	≤41,8 [0,64, p<0,001]*	82,9/38,4	≤35,9 [0,59, p<0,001]	72,8/44,3
index	>144 [0,64, p<0,001]*	62,2/59,8	>145 [0,57, p<0,001]	60,9/50,8
INDEX	>116 [0,61, p<0,001]*	98,9/25,0	>158 [0,62, p<0,001]*	64,4/58,8

Примечания: степень значимости признака: * слабая, ** приемлемая.

простом периодонтите (табл. 1, 2). При этом хронические формы периодонтита не имели статистически значимых различий по большинству параметров стромальной экспрессии COX2 (табл. 1, 2).

ROC-анализ в различных группах периодонтита установил, что большинство параметров экспрессии COX2 обладают слабой и крайне слабой информативностью для разграничения быстропрогрессирующего периодонтита и хронического сложного. Одновременно для дифференциации быстропрогрессирующего периодонтита от хронического простого на этапе манифестации заболевания приемлемым уровнем информативности обладают преимущественно параметры стромальной экспрессии: доля пикселей с высокой и умеренной интенсивностью, а также индексы общей интенсивности и индекс интенсивности в иммунопозитивных участках (табл. 3).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ особенностей экспрессии COX2 в биопсийном материале десен пациентов показал значимо более выраженную экспрессию данного фермента при всех формах периодонтита вне зависимости от характера течения по сравнению с группой контроля. Это подтверждает важную роль COX2 в патогенезе воспаления периодонта без особой специфики в отношении исследованных форм периодонтита и обосновывает возможность уже на этапе манифестации заболевания адъювантного применения COX-ингибиторов (в том числе COX2-селективных) в комплексном нехирургическом лечении пациентов с данной патологией.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Van Dyke T.E., Serhan C.N. (2003) Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*, vol. 82, no 2, pp. 82–90. DOI: 10.1177/154405910308200202
2. Tonetti M.S., Greenwell H., Kornman K.S. (2018) Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*, vol. 89, no 1, pp. 159–172. DOI: 10.1002/JPER.18-0006
3. Lohinai Z., Stachlewitz R., Szekely A. (2001) Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. *Life sciences*, vol. 70, no 3, pp. 279–90. DOI: 10.1016/S0024-3205(01)01391-1
4. Fracon R.N., Teófilo J.M., Satin R.B. (2008) Prostaglandins and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. *Journal of Oral Science*, vol. 50, no 3, pp. 247–252. DOI: 10.2334/josnusd.50.247
5. Vardar S., Baylas H., Huseyinov A. (2003) Effects of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition on Gingival Tissue Levels of Prostaglandin E2 and Prostaglandin F2α and Clinical Parameters of Chronic Periodontitis. *J Periodontol*, vol. 74, pp. 57–63. DOI: 10.1902/jop.2003.74.1.57
6. Oliveira T.M., Sakai V.T., Machado M.A. (2008) COX-2 inhibition decreases VEGF expression and alveolar bone loss during the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*, vol. 79, pp. 1062–1069. DOI: 10.1902/JOP.2008.070411
7. Queiroz-Junior C.M., Pacheco C.M., Maltos K.L. (2009) Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. *Journal of periodontal research*, vol. 44, no 2, pp. 153–60. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2007.01069.x
8. Moro M.G., Dos Santos Oliveira M.D., De Oliveira L.R. (2019) Effects of Selective Versus NonSelective COX-2 Inhibition on Experimental Periodontitis. *Brazilian Dental Journal*, vol. 30, no 2, pp. 133–138. DOI: 10.1590/0103-6440201902241
9. Gerstenfeld L.C., Thiede M., Seibert K. (2003) Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Orthop Res*, vol. 21, no 4, pp. 670–675. DOI: 10.1016/S0736-0266(03)00003-2
10. Etikala A., Tattan M., Askar H., Wang H-L. (2019) Effects of NSAIDS on Periodontal and Dental Implant Therapy. *Compendium*, vol. 40, no 2. Available at: <https://www.aegisdentalnetwork.com/cced/2019/02/effects-of-nsaids-on-periodontal-and-dental-implant-therapy>