

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И. М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Гостев Михаил Сергеевич

**Экспериментальное обоснование применения биорезорбируемых  
персонализированных коллагеновых мембран для закрытия дефектов  
слизистой оболочки рта**

3.1.7. Стоматология

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

кандидат медицинских наук, доцент

Дьячкова Екатерина Юрьевна

доктор химических наук, доцент

Тимашев Петр Сергеевич

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ МЕМБРАН ИЗ КОЛЛАГЕНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СТОМАТОЛОГИИ .....	13
1.1. Дефекты слизистой полости рта. Причины возникновения, методы лечения.....	13
1.2. Применение мембран для устранения дефектов мягких тканей полости рта..	20
1.3. Получение коллагеновых мембран .....	27
1.4. Свойства лактоферрина .....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	38
2.1. Разработка мембран и изучение их физических свойств .....	38
2.1.1. Метод изготовления коллагеновых мембран из ахиллова сухожилия крупного рогатого скота .....	38
2.1.2. Изучение свойств полученных мембран.....	41
2.2. Экспериментальное исследование <i>in vivo</i> (на лабораторных животных).....	44
2.2.1. Характеристика лабораторных животных и условия их содержания .....	44
2.2.2. Дизайн исследования .....	46
2.2.3. Гистологическое исследование биоптатов челюстей кроликов .....	49
2.3. Микробиологическое исследование адгезии микроорганизмов полости рта к коллагеновым мембранам.....	53
2.4. Статистическая обработка данных .....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	59
3.1. Результаты изучения свойств разработанных мембран .....	59
3.2. Результаты экспериментального исследования на лабораторных животных .....	66
3.2.1. Результаты контрольных осмотров в послеоперационном периоде .....	66
3.2.2. Результаты морфологического исследования.....	71
3.3. Результаты микробиологического исследования .....	84

ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	91
ВЫВОДЫ .....	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

В современной стоматологической практике особое внимание уделяется состоянию прикрепленной кератинизированной десны в области зубов и имплантатов. Прикрепленной называют часть десны, расположенную апикально от десневой борозды до слизисто-десневого соединения. Дефицит прикрепленной кератинизированной десны может быть причиной рецессии десны, периимплантита, а также препятствовать удержанию съемного протеза [19, 25, 40, 3, 4], причем риск развития послеоперационных осложнений варьирует от 20 до 80 % [34].

Наибольшее распространение для увеличения глубины преддверия полости рта и зоны прикрепленной кератинизированной десны получила вестибулопластика по Кларку, при которой раневая поверхность надкостницы заживает вторичным натяжением. Недостатком данной методики является наличие рубцовых изменений слизистой оболочки и образование соединительнотканых уплотнений в области операционного вмешательства [95].

Для закрытия послеоперационных ран в области преддверия полости рта предложено также использовать материалы биологического (аутогенного, аллогенного, ксеногенного) происхождения в расчете на их биоинтеграцию. Преимущества аутогенных материалов во всех областях медицины убедительно доказаны многими клиническими и лабораторными исследованиями [14, 151, 37].

### **Степень разработанности темы исследования**

Использование аутогенных трансплантатов нередко требует проведения дополнительной операции в донорской области по причине того, что пересаженный лоскут может атрофироваться и даже некротизироваться. Кроме того, в связи с недостаточным объемом свободных тканей слизистой оболочки

твердого неба закрытие больших дефектов слизистой оболочки не представляется возможным. После забора аутотрансплантата на небе остается открытая раневая поверхность, которая заживает вторичным натяжением. Послеоперационное течение сопровождается значительным дискомфортом для пациентов, что сильно ограничивает применение данного метода в хирургической практике [22, 33, 231].

Альтернативным методом создания объема прикрепленной кератинизированной десны является применение материалов на основе коллагена. На сегодняшний день на рынке представлено большое количество коллагенсодержащих мембран. Повышенный интерес к мембранам из коллагена обусловлен их свойствами: биосовместимостью, биодegradацией, прочностью, эластичностью, способностью формировать различные структуры [5].

Широкое применение получил материал Mucograft компании «Geistlich Pharma AG» (Швейцария), который представляет собой коллагеновый матрикс, как современное средство для расширения зоны прикрепленной десны. Гистологическое изучение биоптатов слизистой оболочки десны показывает, как происходит регенерация многослойного плоского ороговевающего эпителия и подэпителиальной собственной пластинки слизистой [8, 2, 221].

Социальная значимость разработок биосовместимых материалов отечественного производства в рамках программы Президента РФ по импортозамещению обусловлена потребностями медицины в материалах, обладающих регулируемой биологической активностью и обеспечивающих активацию репаративных процессов [9].

В Институте регенеративной медицины Первого МГМУ им. И. М. Сеченова разработана новая коллагеновая мембрана, полученная из бычьего ахиллова сухожилия. Персонализация мембраны достигается за счет регулирования структуры материала, в частности пористости и контроля инвазии в него окружающих тканей, степени сшивки коллагеновых волокон и регулирования сроков биодegradации в организме.

Представляет интерес исследовать в эксперименте на животных эффективность применения новой персонализированной коллагеновой мембраны

для закрытия раневых дефектов слизистой оболочки рта для обоснования возможного применения в будущем у пациентов при проведении операций в полости рта. Выполнение работ по диссертационному исследованию было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации заявка на грант № 23-075-67362-1-0-0409-000377 (Сеченовский Университет).

### **Цели и задачи исследования**

#### **Цель:**

Повышение эффективности лечения пациентов с обширными операционными раневыми дефектами слизистой оболочки рта путем научного обоснования применения разработанной персонализированной коллагеновой мембраны из бычьего ахиллова сухожилия в эксперименте.

#### **Задачи:**

1. Изучить механические свойства новой «персонализированной коллагеновой мембраны»: прочность на разрыв, удлинение при разрыве (модель Юнга).
2. Оценить *in vivo* особенности заживления обширных раневых дефектов в полости рта лабораторных животных в естественных условиях при использовании новых биорезорбируемых мембран из персонализированного коллагена и коллагенового матрикса Mucograft.
3. По данным гистологического метода исследования определить различия в динамике регенерации мягких тканей при применении новых биорезорбируемых мембран из персонализированного коллагена, коллагенового матрикса Mucograft и заживления раневой поверхности вторичным натяжением.
4. Определить рост микрофлоры полости рта на поверхности коллагеновых мембран в эксперименте *in vitro*.

## Научная новизна

1. Впервые был применен аппаратный способ для изучения механических свойств новых «персонализированных коллагеновых мембран»: прочность, растяжимость, абсорбция.

2. Впервые исследовали эффективность «персонализированных коллагеновых мембран» для закрытия дефектов слизистой оболочки полости рта в эксперименте на кроликах.

3. Впервые провели оценку *in vivo* состояния слизистой оболочки полости рта с применением «персонализированных коллагеновых мембран» у лабораторных животных.

4. Впервые в эксперименте провели сравнительный гистологический анализ регенератов слизистой оболочки полости рта кроликов после пластики с применением «персонализированных коллагеновых мембран», коллагенового матрикса Mucograft «Geistlich Pharma AG» (Швейцария) и раневой поверхности, заживающей вторичным натяжением.

5. Впервые в эксперименте провели сравнительный микробиологический анализ адгезии микроорганизмов полости рта к коллагеновым мембранам.

## Теоретическая и практическая значимость работы

Совместно с Научно-техническим парком биомедицины было проведено всестороннее изучение свойств разработанной коллагеновой матрицы, полученной из ахиллова сухожилия крупного рогатого скота, и оценена ее потенциальная эффективность применения в хирургической стоматологии для устранения обширных дефектов слизистой оболочки полости рта. Разработана методика изготовления коллагеновой матрицы, в том числе внесение в ее состав молекул лактоферрина, имеющего антибактериальные свойства, что особенно важно для материалов, применяемых в стоматологии.

Усовершенствованные и предложенные для практической деятельности техника операций — ограниченной вестибулопластики по Кларку — и закрытие донорской зоны на твердом небе при заборе соединительнотканного трансплантата с применением разработанной коллагеновой матрицы позволяют улучшить качество жизни пациентов в послеоперационном периоде за счет сокращения сроков заживления ран, снижения выраженности отека в данной области. Полученные результаты позволяют говорить об активации регенерации слизистой оболочки полости рта в области обширных раневых дефектов за счет применения «персонализированной коллагеновой мембраны».

### **Методология и методы исследования**

Работа построена на основании классического научного дизайна и является результатом экспериментального исследования, состоящего из двух частей: лабораторной *in vitro* и выполненной *in vivo* — на лабораторных животных. Всесторонний анализ состояния решаемой проблемы проведен на основании результатов поиска доступных научных источников в базах данных — как отечественных (E-Library), так и зарубежных (Scopus, Web of Science, Google Scholar).

В диссертационном исследовании применены общепринятые лабораторные экспериментальные методы.

Лабораторные методы:

1. Анализ механических свойств «персонализированной коллагеновой мембраны» и мембраны с лактоферрином: прочность, растяжимость, абсорбция. Механические свойства образцов сшитых и несшитых коллагеновых пленок протестированы во влажном состоянии с использованием микромеханической испытательной системы Mach-1 v 500 (Biomomentum Inc., Лаваль, Квебек, Канада). Тестирование образцов во влажном режиме проведено после их инкубации PBS в течение ночи 4 °С. Прочность на разрыв, удлинение при разрыве и модуль упругости (модуль Юнга) измерены во время одноосного растяжения по меньшей

мере пяти образцов размерами 30\*5 мм и представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение [1].

2. Проведен сравнительный анализ эпителизации слизистой оболочки полости рта лабораторных животных (кролики) с применением «персонализированной коллагеновой мембраны» и раневой поверхности, заживающей вторичным натяжением, на сроках выведения животных 14 суток.

3. Проведено изучение адгезии микроорганизмов полости рта человека к коллагеновым мембранам (персонализированной коллагеновой мембране, персонализированной коллагеновой мембране с лактоферрином и коллагеновому матриксу Mucograft «Geistlich Pharma AG» (Швейцария) на питательных средах методами дисков с количественным анализом изменения содержания микроорганизмов в динамике.

Данные, полученные по результатам проведенных исследований, были статистически обработаны с помощью современных методов, принятых в экспериментальной и клинической медицине.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Оптимальным вариантом мембраны по результатам изучения физических свойств являются мембраны типа «интерфейс», которые на одной из своих сторон имеют пористую структуру, на обратной — непористую, так как обладают высокой прочностью на разрыв и низкой цитотоксичностью.

2. Использование биорезорбируемых мембран из персонализированного коллагена и коллагенового матрикса Mucograft способствует более благоприятному течению послеоперационного периода и сокращению сроков эпителизации раневого дефекта слизистой оболочки рта лабораторных животных, чем при заживлении дефектов вторичным натяжением ( $p < 0,05$ ).

3. Результаты морфологического исследования свидетельствуют о регенерации мягких тканей с вестибулярной стороны верхней челюсти и на твердом небе в полном объеме в случае использования мембран из

персонализированного коллагена и персонализированного коллагена с лактоферрином. При этом плотность вновь образованных кровеносных сосудов на единицу площади была значительно выше при использовании разработанных мембран, чем в случае применения матрикса Mucograft (560, 490 и 410 на кв. мм, соответственно,  $p < 0,05$ ), что свидетельствует о качестве регенерата и прогнозирует сохранение объема тканей в отдаленном послеоперационном периоде.

4. Анализ показателей микробного роста условно-патогенных микроорганизмов, колонизировавших поверхность различных коллагеновых мембран в эксперименте, показал их допустимые значения на всех сроках исследования (до 7 суток). Причем колонизация разработанной мембраны из персонализированного коллагена достоверно не отличалась от таковой коллагенового матрикса Mucograft, а для разработанной коллагеновой мембраны с лактоферрином показатели микробного роста были достоверно меньше ( $p < 0,05$ ).

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научных специальностей 3.1.7. Стоматология, области науки: медицинские науки, пунктам 2 и 8 направлений исследования, и 1.5.22. Клеточная биология, пунктам 10 и 14 направлений исследования.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Диссертация построена на принципах доказательной медицины, что подтверждено достаточным объемом экспериментального материала и оптимальным дизайном исследования. Все данные, использованные для формирования основных научных положений работы, получены с использованием сертифицированного оборудования и методов. В работе применены современные методики математической обработки количественных результатов, статистические критерии использованы после предварительной проверки на нормальность

распределения, для попарного и множественного сравнения использованы соответствующие статистические критерии. Для обработки полученных данных применяли современные методы статистической обработки данных с подбором оптимальных критериев для множественного сравнения после проверки нормальности выборок.

Основные положения работы доложены и обсуждены на Юбилейной конференции по медицинской микологии и микробиологии (г. Москва, 17–18 мая 2023 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы современной стоматологии» (г. Воронеж, 22 ноября 2023 г.), XII Национальном конгрессе с международным участием имени Н. О. Миланова «Пластическая хирургия, эстетическая медицина и косметология» (г. Москва, 13 декабря 2023 г.). Апробация диссертационной работы проведена на совместном заседании учебно-методической конференции кафедры хирургической стоматологии Института стоматологии имени Е. В. Боровского, кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии Института стоматологии имени Е. В. Боровского, кафедры терапевтической стоматологии Института стоматологии имени Е. В. Боровского, кафедры госпитальной хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Института стоматологии имени Е. В. Боровского, кафедры профилактики и коммунальной стоматологии Института стоматологии имени Е. В. Боровского и Научно-технического парка биомедицины (г. Москва, 12 февраля 2024 г., протокол № 9 от 12.02.2024 г.).

Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертации внедрены в учебный процесс кафедры хирургической стоматологии Института стоматологии имени Е. В. Боровского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины хирургическая стоматология по направлению подготовки (специальности) 3.1.7. Стоматология. Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертации внедрены в лечебный процесс отделения хирургической стоматологии Института стоматологии имени Е. В. Боровского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет).

### **Личный вклад автора**

Автором проведен детальный анализ отечественной и зарубежной литературы, на основании которого определено научное направление данной работы и написан обзор литературы, сформулированы цель и задачи исследования, разработан дизайн исследования и выбраны методы. Автором было лично осуществлено оперативное вмешательство на лабораторных животных, проведены контрольные осмотры и необходимые физические замеры, прямое участие в подготовке препаратов для дальнейшего гистологического исследования. Автор самостоятельно обработал результаты исследования и вместе с соавторами подготовил публикации по всем разделам диссертации.

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования автором опубликовано 8 работ, из них 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 научная статья — в системе базы данных Scopus; 4 — материалы всероссийских и международных конференций (тезисы).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения и заключения, выводов и практических рекомендаций, списка литературы. Работа иллюстрирована 25 рисунками и содержит 16 таблиц. Список литературы включает в себя 231 литературный источник, из них 40 российских и 191 зарубежный. Диссертация изложена на русском языке.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ МЕМБРАН ИЗ КОЛЛАГЕНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СТОМАТОЛОГИИ

## 1.1. Дефекты слизистой полости рта. Причины возникновения, методы лечения

Слизистая оболочка полости рта играет ключевую роль в структуре ротовой полости и служит своего рода «воротами» в организм. Отличаясь от других тканей ротовой полости, она выделяется своей уникальной устойчивостью к физическим, термическим и химическим воздействиям, эффективно противостоит проникновению инфекций и обладает высоким потенциалом регенерации [11, 13]. В зависимости от местоположения и функций слизистую оболочку полости рта можно разделить на три типа: жевательную, выстилающую (покровную) и специализированную [11]. Понимание ее структуры и функций имеет большое значение для медицинской диагностики, лечения и научных исследований.

Слизистая оболочка полости рта образована тремя основными слоями: эпителием, собственной пластинкой и подслизистой тканью. На разных участках эти слои имеют различную выраженность. Например, на спинке языка, твердом небе и деснах преобладает эпителиальный слой, в то время как в области губ и щек собственная пластинка более выражена. В некоторых зонах, таких как переходная складка и дно полости рта, сильно выражена подслизистая ткань. Отмечено, что в полости рта отсутствует четкая мышечная пластинка, поэтому собственная пластинка плавно переходит в подслизистую основу. На некоторых участках полости рта подслизистая основа может полностью отсутствовать [7, 36]. Эпителий слизистой оболочки полости рта — толстый (200–600 мкм) многослойный плоский неороговевающий с участками ороговения только в отделах, которые подвержены повышенной механической нагрузке (дорсальная поверхность языка, твердое небо, десна) [10, 11]. Согласно исследованию, проведенному Сельдой Гокташ, Джоном Д. Дмитриком и Питером С. МакФетриджем, кератинизированная

слизистая оболочка десны превосходит некератинизированную по устойчивости к растяжению и жесткости. Более того, плотно расположенные эластичные волокна в некератинизированной слизистой области обеспечивают ей высокие вязкоупругие характеристики. Динамический анализ сжатия также показывает, что при увеличении частоты нагрузки и амплитуды деформации мгновенный модуль, установившийся модуль и пиковое напряжение все возрастают, особенно это выражено с вестибулярной стороны десны [127].

### **Архитектоника слизистой оболочки полости рта**

Слизистая оболочка (жевательная), покрывающая твердое небо и десны и участвующая преимущественно в механической обработке пищи, имеет в составе ороговевающий эпителий, что обеспечивает ей дополнительную защиту от механических повреждений, таких как жевание и грызение. Она практически неподвижна, обладает высокой механической прочностью и низкой проницаемостью [188]. По данным исследований, у женщин средняя толщина жевательной слизистой оболочки была значительно меньше, чем у мужчин [228]. В данном типе слизистой оболочки полости рта ороговевающий эпителий плотно прикреплен к подлежащим тканям с помощью коллагеновой соединительной ткани или собственного слоя. Исходя из измерений, проведенных учеными Коллинсом и Доусом [89], можно определить, что жевательная слизистая оболочка занимает приблизительно 25 % от общей площади слизистой оболочки полости рта.

Выстилающая (покровная) слизистая оболочка включает слизистую оболочку губы, щеки, дна полости рта, альвеолярного гребня верхней и нижней челюстей, оральной поверхности мягкого неба и вентральной поверхности языка. Она покрыта неороговевающим эпителием, подвижна и эластична, прикреплена преимущественно к мышцам, частично — к кости. Она растяжима и, по сравнению с другими участками слизистой оболочки полости рта, наиболее проницаема для различных веществ [7, 11], что может обеспечить возможность применения мукозальной системы доставки лекарственных средств. Эта оболочка не является

равномерно проницаемой тканью, как кишечник, и демонстрирует региональные различия. Кератинизированные области, такие как десна и твердое небо, наименее проницаемы, в то время как некератинизированные области — наиболее. Эти различия, по-видимому, связаны с вариативностью типов липидов, составляющих межклеточный барьер проницаемости в поверхностных слоях эпителия. Они могут быть связаны с региональными различиями и в распространенности некоторых заболеваний слизистой оболочки и использованы для локальной и системной доставки лекарственных препаратов. Исследования по доставке лекарств через слизистую оболочку растут экспоненциально, и подвижная слизистая, благодаря своему богатому кровоснабжению и хорошей проницаемости, рассматривается как перспективная площадка для локальной и системной доставки лекарств [171]. Также было показано, что алкоголь может усиливать проникновение канцерогенов, таких как нитрозонорникотин, через слизистую оболочку с оральной стороны, особенно в области десен и дна полости рта [188].

Специализированная слизистая оболочка покрывает дорсальную поверхность языка, выстлана ороговевающим и неороговевающим эпителием, характеризуется наличием особых сосочков и вкусовых рецепторов, прикреплена к подлежащей мышечной ткани, умеренно подвижна и прочна механически [11, 7]. Рецепторы восприятия вкуса играют важную роль не только в выборе пищи, но и во взаимодействии с микроорганизмами. Исследования показали, что рецепторы вкуса, в частности горькие и сладкие, широко распространены в различных тканях, включая кишечный эпителий, дыхательные пути и десны. Они участвуют во взаимодействии между поверхностью слизистой оболочки и микроорганизмами, реагируя на широкий спектр метаболитов. Например, было обнаружено, что различные клетки полости рта, выражающие рецепторы вкуса, такие как одиночные хемосенсорные клетки десен и эпителиальные клетки десен, могут обнаруживать сигналы бактерий через горькие рецепторы вкуса, активируя таким образом врожденные иммунные ответы организма и регулируя микробный гомеостаз полости рта [186].

Таким образом, глубокое понимание структуры и функций слизистой оболочки полости рта не только помогает нам лучше понять ее роль в повседневных функциях, но также направляет на разработку более эффективных методов лечения и профилактических мероприятий для поддержания и улучшения здоровья полости рта.

Полость рта представляет собой сложную анатомическую область, разделенную на многочисленные пространства и подпространства, на которые могут влиять многие патологические состояния, связанные с развитием воспалительного или опухолевого процесса [185, 187, 178]. Наибольший интерес представляет именно опухолевая патология, особенно плоскоклеточный рак (ПКР), который включает около 90 % всех новообразований полости рта [178], так как своевременная диагностика необходима для выбора оптимального лечения и хорошего прогноза для пациентов. ПКР полости рта чаще встречается в Восточной Европе и Южной Азии, причем основная распространенность приходится на мужской пол на пятом десятилетии жизни. Это тесно связано с употреблением алкоголя и табака [178]. Некоторые предраковые поражения, такие как лейкоплакия, эритроплакия, красный плоский лишай полости рта и подслизистый фиброз полости рта, в результате постоянного воздействия факторов риска могут переродиться в ПКР полости рта. Методом выбора является хирургическое лечение с последующим прохождением адъювантной терапии: лучевая терапия ± химиотерапия в зависимости от стадии TNM [178]. С учетом радикальности оперативного вмешательства часто формируются обширные критические дефекты мягких тканей полости рта, не способные к самостоятельной регенерации, объем которой резко снижен из-за адъювантной терапии [15, 23, 30]. Первым шагом в диагностике при любом подозрении на патологию полости рта является простое клиническое обследование с использованием прямого видимого и белого света или улучшенной оптической эндоскопии, которая позволяет легко оценить повреждения слизистой оболочки (поверхностные) [124, 141]. С другой стороны, мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ) являются решающими и взаимодополняющими в изучении

подслизистых и инфильтрирующих заболеваний полости рта методами исследования [141], тогда как ультразвуковое исследование и конусно-лучевая компьютерная томография (КЛКТ) по-прежнему играют лишь незначительную роль [139, 133]. Позитронно-эмиссионная томография с 18-фтордезоксиглюкозой (18F-ФДГ ПЭТ) не позволяет проводить полноценную макроморфологическую оценку, такую как МСКТ и МРТ, однако она полезна для выявления скрытых новообразований полости рта при обычной визуализации, лимфатических узлов и других отдаленных метастазов, а также рецидивов после лучевой терапии [41, 76, 46]. Двухэнергетическая компьютерная томография (ДКТ) — это новейший метод с очень перспективными приложениями в изучении рака полости рта, хотя его рутинное использование фактически ограничено низкой доступностью как в государственных, так и в частных медицинских центрах [106, 215].

Одним из наиболее часто встречающихся осложнений при удалении верхнечелюстных моляров и премоляров (зубов с близостью или даже проекцией корней в пределах верхнечелюстной пазухи) является образование ороантрального соустья [149], при хирургическом устранении которых также применяют коллагеновые мембраны [12]. Ороантральное соустье является неестественным сообщением между верхнечелюстной пазухой и полостью рта. При планировании несъемного протезирования на дентальных имплантатах формирование ороантрального соустья возможно еще на этапе увеличения объема альвеолярного гребня — после перфорации мембраны Шнайдера при проведении синус-лифтинга, а также при неправильной установке дентального имплантата [82]. В дополнение к ятрогенным причинам развития ороантрального сообщения также может возникнуть после травмы, инфекционных осложнений или даже опухолей, которые в процессе своего роста разрушают верхнечелюстную кость [100]. К возможным причинам ороантрального сообщения также относят медикаментозно-ассоциированный остеонекроз верхней челюсти [26].

Некоторые исследования были направлены на поиск оптимального медикаментозного и хирургического методов лечения для улучшения прогноза у пациентов. В этом контексте щечный жировой лоскут был успешно использован

для лечения ороантральных сообщений, вызванных остеонекрозом [118]. Дефекты небольшого размера (<2 мм) могут заживать спонтанно за счет образования тромбов и вторичного заживления, в то время как дефекты большего размера требуют хирургического лечения. Дефекты более 3 мм следует лечить хирургическим путем, чтобы избежать развития дальнейших осложнений [149]. Однако недиагностированные и вовремя не вылеченные инфекционные процессы из-за постоянного контакта с полостью рта и неправильного дренирования пазух носа остаются довольно распространенным явлением. Если ороантральное сообщение не устранить хирургическим путем в момент его создания (при ятрогенной этиологии), то сформируется постоянный ороантральный свищ, а слизистая оболочка пазухи приобретет полипозный характер, изъязвления, эпителиальную метаплазию, фиброз. Эти изменения характерны для хронических ороантральных свищей и хронического верхнечелюстного синусита. Наряду с хирургическим лечением при ирригации ороантральных сообщающихся пазух или даже радикальной операцией на пазухах носа должно быть выполнено вмешательство Колдуэла-Люка [149, 82, 100, 118, 67].

Лечение и профилактика осложнений при работе на мягких тканях полости рта имеет ключевое значение в современной дентальной имплантологии и влияет на биологические и эстетические результаты. Таким образом, оценка состояния мягких тканей с количественной и качественной точки зрения должна быть частью общего плана лечения. Подобная оценка определяет потенциальные показания, а также оптимальный момент времени для дополнительного вмешательства на мягких тканях. Надлежащая оценка риска и уход за мягкими тканями в планируемом месте дентальной имплантации имеют ключевое значение перед любой операцией.

В последнее время появляются данные, свидетельствующие о том, что околоимплантные мягкие ткани являются ключевыми для поддержания здоровья после имплантации [230, 223]. Текущие долгосрочные клинические исследования показали наличие стабильных и здоровых мягких тканей после дентальной

имплантации через 7 [103] и 12 лет [169] даже в случае отсутствия щечной кортикальной пластинки в области установленного дентального имплантата.

В различных публикациях нередко акцентируют внимание на наличии мягких тканей в зоне дентальной имплантации как с биологической [146, 167, 218], так и с эстетической точки зрения [200, 104]. Соответственно, были предложены различные показания [44, 207, 201] и варианты лечения [113, 210] при их дефиците.

Случаи осложнений в области мягких тканей после дентальной имплантации обычно включают: отсутствие или недостаток прикрепленной слизистой оболочки, общий недостаточный объем мягких тканей, несостоятельность послеоперационной раны с формированием вторичных дефектов слизистой оболочки; рецессия слизистой оболочки после имплантации [132, 108, 169]. В случае дефицита мягких тканей их недостаток следует устранять как можно раньше, чтобы повысить предсказуемость хирургических вмешательств [17].

Рецессия мягких тканей после дентальной имплантации может быть серьезным эстетическим осложнением, преимущественно во фронтальном отделе верхней челюсти. Очевидно, что ряд факторов влияет на уровень краевой слизистой оболочки [123]. Было показано, что при их отсутствии потенциальное негативное влияние на стабильность слизистой оболочки вокруг дентального имплантата может оказывать состояние слизистой оболочки — в том числе ее толщина — и уровень прикрепления межзубных сосочков у соседних зубов [112].

Для увеличения толщины слизистой оболочки и устранения дефицита объема мягких тканей вокруг зубных имплантатов успешно применяются процедуры пересадки мягких тканей. При отсутствии прикрепленной слизистой оболочки предпочтительным методом лечения является процедура коронального смещения лоскута в сочетании или без с вестибулопластикой при использовании свободного соединительнотканного трансплантата или без него [113]. Добавление субэпителиального соединительнотканного трансплантата продемонстрировало улучшение эстетических свойств, оцениваемых по розовой эстетической шкале, и уменьшение срединной рецессии мягких тканей вокруг имплантата [42, 110].

Следовательно, профилактика и лечение осложнений мягких тканей жизненно важны для предотвращения неблагоприятных исходов в челюстно-лицевой хирургии, хирургической стоматологии и в дентальной имплантологии в частности [223].

## **1.2. Применение мембран для устранения дефектов мягких тканей полости рта**

В стоматологии барьерные мембраны используют для улучшения прогноза при регенерации тканей пародонта, в том числе в области бифуркации и в процессе синус-лифтинга при увеличении объема костной ткани верхней челюсти, связанного с имплантационным лечением [129, 131]. В 1982 году Ниману и др. [182] удалось получить новое прикрепление пародонта к зубу человека путем направленной тканевой регенерации с помощью барьерной мембраны. С тех пор исследования в области регенерации пародонта, в том числе совершенствование протоколов операций, таких как направленная регенерация тканей (GTR) и направленная костная регенерация (GBR), продвинулись вперед и получили широкое применение в клинической практике [120]. Барьерные мембраны, имплантированные поверх тканей области дефекта костей, препятствуют инвазии клеток из эпителия десны и соединительной ткани [168]. Как показали исследования, для барьерных мембран функция «экранирования» должна длиться не менее 4–6 недель в случае направленной регенерации тканей пародонта и не менее 4–6 недель при проведении направленной костной регенерации [70, 85], поэтому барьерные мембраны должны сохраняться между десной и альвеолярной костью дольше приведенных временных рамок. Барьерная функция, с одной стороны, сохраняет пространство формирования новых тканей, а с другой — избирательно направляет клетки из пародонта или окружающей кости в зону дефекта [142, 143].

На сегодняшний день получены многочисленные клинические результаты о применении различных барьерных мембран [206, 66, 68, 88].

Требуемыми свойствами для барьерных мембран являются:

- высокая биосовместимость;
- низкая проницаемость для клеток;
- герметичность;
- адгезия к тканям пациента;
- умеренная механическая прочность (с учетом функции);
- стабильность при хранении;
- удобство использования в клинических условиях [183, 176].

По механическим свойствам барьерные мембраны должны выдерживать давление прилегающей десны и сохранять свою форму без потери пространства для регенерации тканей [173]. Кроме того, мембраны должны легко подвергаться пластической деформации без разрушения, сохранять свою морфологию после имплантации в ткани пациента [66].

Барьерные мембраны предназначены для стимуляции процесса регенерации тканей и могут быть разделены на несколько видов в зависимости от биоразлагаемости их основного составляющего материала.

В последние годы использование биоразлагаемых мембран стало основным направлением в направленной тканевой регенерации, однако небiorазлагаемые продукты часто применяют при массивной потере тканей и вертикальных костных дефектах из-за их преимуществ в формировании и поддержке регенеративного пространства [93].

Область применения барьерных мембран расширяется, и эволюция биоматериалов для их изготовления становится неизбежной.

Следовательно, выбор мембраны для клинического применения должен включать в себя больше, чем ориентирование на скорость биодеградации мембраны, и учитывать особенности других компонентов мембран. Более того, даже для имеющихся в настоящее время при использовании мембран не всегда существуют четкие последовательные протоколы применения и данные о других свойствах, кроме как о биоразлагаемости, оставляя выбор материала на усмотрение врача [66].

Биоразлагаемые мембраны, которые почти исключительно всегда имеют полимерную основу (природные и синтетические полимеры), имеют преимущества по сравнению с нерезорбируемыми в виде меньшего числа осложнений и низкой стоимости, а также отсутствия необходимости проведения повторных операций по их извлечению [203]. Таким образом, биоразлагаемые мембраны считаются материалом выбора, когда ожидаемые результаты должны быть не хуже, чем в случае применения небiorазлагаемых материалов. Однако резорбируемые мембраны склонны содействовать обнажению тканей и, как следствие, нарушению регенерации из-за потери объема мембраны и побочных продуктов ее деградации [132].

В случае коллагеновых мембран животного происхождения внутри материала могут оставаться частицы, зараженные вирусом, и перекрестные сшивки молекул, которые могут вызывать те или иные нежелательные реакции при применении мембран [115].

В целом биоразлагаемые мембраны демонстрируют более низкую механическую прочность и, следовательно, менее эффективны в формировании регенеративного пространства, чем нерезорбируемые из политетрафторэтилена (ПТФЭ) или титановая сетка. По этой причине резорбируемые мембраны гораздо реже используются при направленной костной регенерации в обязательном порядке с костнопластическими материалами для обеспечения поддержания ее формы и создаваемого регенеративного пространства.

Как уже было сказано выше, чаще всего резорбируемые мембраны производят из природных или синтетических полимеров.

К природным полимерам, которые применяют для создания натуральных рассасывающихся мембран, относят коллагены I и III типов, полученные из крупного рогатого скота и свиней [227, 115].

Коллаген является важным компонентом костей и соединительной ткани и обеспечивает поддержку этих тканевых структур [140]. Коллаген получают из кожи, сухожилий и кишечника животных, затем обрабатывают с децеллюляризацией, проводят сшивку фибрилл и стерилизуют [208]. Существуют

различные методы для сшивки, включая ультрафиолетовое облучение и химическую обработку с использованием водорастворимого глутаральдегида, карбодиимида и генипина [203]. Такие методики повышают устойчивость мембран к гидролизу и в свое время позволили разработать сохраняемые в человеческом теле не менее, чем 6 месяцев, мембраны для направленной костной регенерации [70]. Однако остаточные агенты при химической сшивке вызывали трудности при клиническом применении мембран из-за своей потенциальной токсичности, вызывающей воспаление и ингибирующей клеточные процессы [86]. Поперечная сшивка структур в мембранах резко улучшает механические свойства, однако их низкая жесткость остается существенным недостатком этого метода [208]. Таким образом, коллагеновые мембраны лучше подходили для применения в областях, в которых их было легко разместить.

Существует достаточно большое число исследований об аугментации костной ткани и эффективности коллагеновых мембран при направленной костной регенерации [75]. Авторы показали, что костеобразование с коллагеновыми мембранами было сопоставимо с объемом, наблюдаемом при использовании мембраны из ПТФЭ. Также сообщалось, что коллагеновые мембраны при направленной костной регенерации успешно выполняют и барьерную функцию [130, 217].

Стромальные клетки, фиксирующиеся к коллагеновой мембране, способствуют производству основного роста фибробластов (FGF)-2 и костного морфогенетического белка (BMP)-2, которые стимулируют восстановление костной ткани быстрее, по сравнению с применением только одних биоразлагаемых мембран.

На фазе экспериментальных исследований для создания резорбируемых мембран также рассматривали введение в их структуру хитозана и альгината [63, 102, 172, 205, 224].

Хитозан — полисахарид с прямой цепью, сополимер глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. Его получают промышленным путем с помощью щелочной обработки хитина ракообразных [189]. Хитозан обладает такими

свойствами, как биоразлагаемость, благоприятная биосовместимость и гибкость при модификации в процессе работы, поэтому хитозану придают волокнистую, пленочную и губчатую формы, которые используют для создания хирургического шовного материала и искусственной кожи [195, 84]. Ранее считалось, что биоразлагаемость хитозана зависит от его молекулярной массы [180]. Несмотря на доказанные положительные биоактивные (бактериостатические и гомеостатические) свойства мембран на основе хитозана, их механические свойства остаются довольно низкими, как и у других природных полимеров.

Другой природный полимер, альгинат, получают из морских водорослей. Он весьма популярен в стоматологии в качестве оттискового материала. Альгинатный гидрогель обладает высокой биосовместимостью и имеет структуру, аналогичную внеклеточному матриксу [189, 213, 49]. Исследование *in vivo* показало, что хитозановые и альгинатные мембраны могут выполнять функцию барьера, однако в настоящее время их полноценные клинические исследования по оценке эффективности у пациентов не проводились, поэтому их не применяют в клинической практике [224]. Это может быть связано с сомнительными преимуществами данных мембран перед существующими коммерческими аналогами.

### **Биорезорбируемые синтетические полимеры**

Биорезорбируемы алифатические полиэфиры, такие как полимолочная кислота (ПМК), полигликолевая кислота (ПГК), поликапролактон (ПКЛ) и их сополимеры (например, поли(молочно-гликолевая кислота) (ПМГК) и поли(лактид-ко-капролактон) (ПЛКЛ)), также используют в качестве материалов для создания барьерных мембран (67, 95–100) [222, 101, 134, 94, 122].

Алифатические полиэфирные мембраны могут быть изготовлены по воспроизводимым техническим протоколам, поскольку процесс их получения автоматизирован на производстве. Было показано, что пористая структура таких мембран способствует пролиферации клеток и остеогенной дифференцировке

мезенхимальных стволовых клеток. Также в исследовании было доказано, что двухслойная мембрана ПЛГК может обеспечивать благоприятные условия для регенерации костной ткани *in vivo*; причем формирование кости при двойном слое ПЛГК было в большем объеме, чем при использовании одного [101].

Двухслойная мембрана из ПЛКЛ продемонстрировала в исследовании следующие результаты: твердый слой способствовал снижению бактериальной адгезии и предотвращал проникновение микроорганизмов внутрь мембраны [65]. Данная характеристика потенциально поможет улучшить результат и упростить лечение осложнений направленной тканевой или костной регенерации. Кроме того, мембраны ПЛКЛ биodeградируют медленнее, чем их аналоги из других биоразлагаемых полимеров. Таким образом, двухслойные мембраны из ПЛКЛ считали перспективными для использования при направленной костной регенерации [122].

Коллагеновые мембраны широко применяют в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии при довольно большом спектре операций, в том числе при направленной тканевой регенерации, костной пластике, в реконструктивной пародонтологии [8, 212, 193, 12].

Однако применение резорбируемых коллагеновых мембран требует тщательного укрывания их местными мягкими тканями в связи с потенциальной контаминацией представителями условно-патогенной микрофлоры полости рта поверхности мембраны с последующим негативным влиянием на область устраняемого дефекта, начиная со снижения скорости регенерации в области раны, заканчивая развитием гнойно-воспалительных осложнений в связи с высокой адгезией бактерий на поверхности коллагенового матрикса и их довольно интенсивным ростом [18, 91, 27, 16, 170].

Тканевая инженерия является одной из наиболее важных биотехнологий в биомедицинской области, способной решить вопрос создания оптимальных материалов для хирургической стоматологии. Она требует применения принципов научной инженерии для проектирования и создания природных или синтетических биоматериалов, пригодных для поддержания тканей и органов. В зависимости от

конкретного применения выбор подходящего материала остается важной клинической проблемой. Имплант-ассоциированная инфекция является одним из самых серьезных осложнений при операциях по установке дентальных и других стоматологических имплантатов. Лечение этих инфекций затруднено, поскольку поверхность имплантата служит не только субстратом для формирования биопленки, но и для селекции мультирезистентных бактериальных штаммов. Поэтому перспективным новым подходом к профилактике инфекций, связанных с имплантатами, является разработка новых имплантируемых биоматериалов, обладающих антибактериальными свойствами. Вносимым компонентом с подобным свойством может быть и лактоферрин, который применяют для создания антимикробных биоматериалов на основе пептидов [50, 91]. Как известно, лактоферрин обладает способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку остеобластов, что свидетельствует о его потенциальной эффективности в качестве остеогенного фактора роста в инженерии костной ткани. Однако данный метод применения требует усовершенствования технологии системы доставки лекарственного вещества в зону интереса [107].

Кроме применения в качестве барьера при направленной костной регенерации резорбируемые мембраны применяют и при менеджменте мягких тканей. Так, применение материалов на основе коллагена является альтернативным методом увеличения объема прикрепленной кератинизированной десны. На сегодняшний день в стоматологической имплантологии представлено большое количество коллагенсодержащих мембран. Повышенный интерес к мембранам из коллагена обусловлен их свойствами: биосовместимостью, биodeградацией, прочностью, эластичностью, способностью формировать различные структуры [5].

Широкое применение получил материал Mucograft компании «Geistlich Pharma AG» (Швейцария), который представляет собой коллагеновый матрикс, как современное средство для увеличения зоны прикрепленной десны. Однако по данным последних исследований, его применение при обширных дефектах слизистой полости рта не всегда приводит к формированию необходимого объема

мягких тканей, а гистологическое исследование говорит о недостаточной васкуляризации вновь образованных тканей [175, 29, 24, 32].

При устранении альвеолярной деформации или атрофии возможно успешное применение нерезорбируемых мембран из синтетических материалов (ПТФЭ) [66, 225] или металлов (титан) [181], однако их использование для реконструкции мягких тканей полости рта невозможно в связи с необходимостью их полного интраоперационного закрытия мягкими тканями, что противоречит самой цели данных операций.

### **1.3. Получение коллагеновых мембран**

При производстве коллагеновых мембран методом децеллюляризации натуральных тканей, таких как брыжейка или перикард, в их структуру достаточно трудно внедрить биологически активные вещества (БАВ), поскольку их внедрение будет носить лишь поверхностный характер, и высвобождение из мембран будет происходить по типу взрыва.

Поэтому для создания коллагеновых мембран с содержанием в их структуре БАВ в тканевой инженерии применяются методы реконструирования. Среди них можно выделить электроспиннинг, позволяющий получать мембраны с заданными параметрами, составом, регулируемой степенью анизотропии и пористости. Однако такие мембраны обладают невысокими механическими свойствами и низкой плотностью, что снижает удобство их хирургического применения. Кроме того, при их производстве могут использоваться потенциально токсичные растворители, способные негативно повлиять на окружающие ткани. Другим способом является преципитация коллагена из растворов в изоточке с его последующей механической прессовкой в мембраны и сушкой (на воздухе или при помощи лиофилизации). Однако различные БАВ могут иметь отличное от коллагена значение изоточки, а также дзетта потенциала, что может не позволить одномоментно преципитировать оба компонента смеси (например, при изменении

pH или ионной силы) и получить мембрану с гомогенно распределенными в структуре БАВ.

Одним из возможных решений по улучшению про-регенеративных свойств имплантируемых коллагеновых мембран и исхода лечения является внедрение в их структуру биологически активных веществ (факторов роста, цитокинов, плазмид, антимикробных агентов), которые бы ускоряли и направляли процессы регенерации, снижали воспаление и предотвращали возникновение инфекционных осложнений [60].

Разработка инновационных биоматериалов, направленных на ингибирование как бактериальной адгезии, так и образования биопленок, по-прежнему волнует многих исследователей [61]. По мнению ряда эпидемиологов, биоматериалы, являющиеся депо молекул антибиотиков, могут способствовать селекции и распространению микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью [54]. Современные стратегии, используемые для предотвращения имплант-ассоциированных инфекций, включают покрытие антисептиками, антимикробными полимерами, ионами металлов или органическими молекулами [58]. Эффективность покрытия зависит от клинического применения и конфигурации имплантата. Биоматериалы с длительной антибактериальной активностью для нужд стоматологии были впервые предложены в начале 1950-х годов [145]. Интерес к получению носителей, которые могли бы с некой периодичностью выделять активные молекулы лекарственных веществ непосредственно в локализации инфекционного процесса, постепенно распространился и на резорбируемые и даже растворимые биомедицинские полимеры [99, 191]. Сегодня для биоактивации поверхности имплантатов с целью снижения бактериальной адгезии и улучшения биосовместимости практикуется ряд физических, химических и биологических методов [78].

## Функционализация поверхности антимикробными пептидами

В связи с необходимостью разработки новых методов преодоления устойчивости микроорганизмов к лекарственным препаратам природные антимикробные пептиды (АМП) и их синтетические производные приобрели важное значение в качестве эффективных агентов при различных патологиях благодаря широкому спектру активности против бактериальных (грамотрицательных и грамположительных бактерий, включая лекарственно-устойчивые штаммы) и грибковых микроорганизмов, наряду с низкой токсичностью для собственных клеток человека, малым размером молекул и их высокой стабильностью [57, 126, 214].

Антимикробная терапия на основе пептидов является заменой классической антибиотикотерапии и обладает рядом потенциальных преимуществ [191]. Механизмы противомикробного действия АМП отличаются от традиционных антибиотиков и связаны с их структурой [216]. Общеизвестно, что электростатические взаимодействия, возникающие между АМП и мембраной клетки-мишени, являются первым шагом в их действии, а также обеспечивают снижение устойчивости бактерий [77, 138]. Исходя из их конечного влияния на мембраны клеток-мишеней, АМП можно разделить на два основных класса: мембраноразрушающие и мембранонеразрушающие [220]. Однако к АМП может возникать резистентность. Существует несколько механизмов, таких как изменение клеточной оболочки, протеолитическая деградация пептидов, регуляция эффлюксных насосов и сопротивление со стороны экзополимеров и матричных молекул биопленки [148, 214]. Вследствие устойчивости к АМП, применяемым извне, может возникнуть перекрестная устойчивость к АМП хозяина или антимикробной терапии. Использование синтетических АМП может предотвратить устойчивость к естественным защитным пептидам хозяина (ЕЗПХ) [192]. АМП взаимодействуют с определенными специфическими компонентами бактериальной плазматической мембраны, что приводит к деполяризации, дестабилизации и/или разрушению бактериальной клетки [59]. АМП способны

нейтрализовать факторы вирулентности, выделяемые инфекционными агентами, а также модулировать иммунный ответ хозяина [177] и эффективно атаковать бактерии в биопленке [47].

На сегодняшний день описано более 2 700 различных АМП [45, 216]. Бактериоцины — это бактериальные АМП, которые делятся на бактериоцины класса I, известные как лантибиотики, и бактериоцины класса II / нелантибиотики. Лантибиотики содержат лантионин и 3-метиллантионин и продуцируются грамположительными бактериями, а нелантибиотики содержат немодифицированные пептиды или пептиды с незначительными модификациями [165, 219]. Важнейшие компоненты врожденной иммунной системы АМП являются первой линией защиты против вторгающихся микроорганизмов [81]. АМП, являющиеся частью врожденного иммунитета у самых разных организмов, с катионными и амфифильными свойствами и четко определенными гидрофобными и гидрофильными областями [192], способны усиливать фагоцитоз, стимулировать высвобождение простагландинов, нейтрализовать септическое действие липополисахаридов, способствовать ангиогенезу и накоплению различных иммунных клеток в местах воспаления [116, 214].

Данные пептиды можно разделить на два основных антимикробных типа, исходя из структур аминокислотного состава и их биологических функций [64]: имеющих внутриклеточную активность и действующих на поверхности мембраны инфекционного агента (вируса, бактерии, грибка или паразита). Коллекцию всех известных АМП (более 3 000) можно найти в базе данных Antimicrobial Peptide Database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), но только семь небольших АМП были одобрены Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) [80]. В первое подсемейство входят АМП с линейными молекулами,  $\alpha$ -спиральной структурой и без цистеина, второе подсемейство состоит из цистеин-содержащих полипептидов. Кателицидины и дефенсины — два подсемейства, получаемые от млекопитающих. Кателицидины хранятся в секреторных гранулах нейтрофилов и макрофагов; их высвобождение контролируется активацией лейкоцитов [229, 214].

Дефенсины — небольшие циклические пептиды, очищенные из гранулоцитов, которые делятся на три подсемейства  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\theta$ -дефенсинов [198].

Как правило, природные АМП нестабильны; для клинического применения необходимо синтезировать пептидные длительно существующие аналоги [216]. Механизм действия синтетических АМП включает ингибирование адгезии бактерий к поверхности и/или снижение экспрессии генов, связанных с образованием биопленки [135]. Катионный заряд и пептидная природа синтетических АМП являются проблемой для их биологического потенциала и антимикробной эффективности [59, 214].

Рост устойчивости к антибиотикам стимулировал применение АМП в медицинских изделиях [57]. Инжиниринг поверхности биоматериалов, включая свойства АМП, представляет собой перспективный подход к предотвращению инфекций имплантатов [117]. Таунсенд и соавторы [57] сообщили о двойном покрытии поверхности гидроксиапатита АМП с использованием двух различных механизмов связывания. Ковалентно связанный пептид ингибирует образование биопленки, а электростатически высвобождаемый пептид подавляет рост бактерий. АМП эффективны против широкого спектра микроорганизмов, а также могут работать синергично с классическими антибиотиками, что предотвращает колонизацию бактериями. Интеграция АМП в различные типы носителей в качестве замены антимикробных препаратов или в комбинации с антибиотиками представляется перспективным подходом для профилактики или борьбы с инфекционными процессами в костной ткани [174, 214].

После имплантации в организме происходит конкуренция за поверхность имплантата («гонка за поверхностью») между клетками хозяина, участвующими в регенерации, и патогенными бактериями. Для предотвращения инфекций, связанных с имплантатами, было разработано несколько антимикробных биоматериалов с преимуществами и ограничениями, например, противобрастающие поверхности, поверхности, убивающие контакт, и поверхности, высвобождающие антимикробные вещества [72]. Кроме АМП, для профилактики инфекций, связанных с имплантатами, широко изучали

гидроксиапатит, хитозан, гиалуроновую кислоту, полиметилметакрилат в сочетании с различными антибиотиками [90, 48, 214].

## **Лактоферрин**

Среди БАВ перспективным кандидатом для нужд стоматологии является лактоферрин — натуральный природный агент, обладающий мощной антимикробной и регенеративной активностью. Регенеративный потенциал лактоферрина в отношении многих анатомических структур был подтвержден в ряде доклинических и клинических испытаний, в том числе и в аспекте регенерации эпителиальных барьеров и соединительной ткани, что является особенно актуальным для направленной регенерации тканей в ротовой полости. Кроме того, уникальность лактоферрина в данном случае обусловлена тем, что его спектр антимикробной активности не ограничивается только антибактериальными свойствами, также этот агент обладает противовирусным и противогрибковым действием [157, 20].

### **1.4. Свойства лактоферрина**

Лактоферрин (ЛФ) — это биоактивный глобулярный белок, который относят к семейству трансферринов, вырабатываемый эпителиальными клетками и нейтрофилами различных видов млекопитающих [51]. В здоровых организмах лактоферрин вырабатывается преимущественно нейтрофилами и находится в концентрации  $2-7 \times 10^6$  г/мл. ЛФ — это 80 кДа железосвязывающий многофункциональный гликопротеин, источник катионных и гидрофобных антимикробных пептидов, обнаруженный в большинстве экзокринных секретов, таких как молоко, молозиво, слюна, моча, слезы, носовое и бронхиальное отделяемое, маточный секрет, амниотическая жидкость, вагинальная жидкость, сперма, желчь и желудочно-кишечные жидкости, а также во вторичных гранулах нейтрофилов [87, 214].

ЛФ играет специфическую роль в усилении липидного обмена и может способствовать выработке цитокинов и хемокинов [150, 128]. Биомиметические кристаллы гидроксиапатита, нанокристаллы, поверхности биогенного кремнезема, функционирующие с биоактивными молекулами, такими как ЛФ, играют важную роль в различных областях применения, включая медицину, фармацевтику, наноустройства, биосенсоры, биоинженерию и регенеративную терапию в целом [125]. Наиболее изученными являются антимикробные свойства ЛФ. В эту активность вовлечено несколько механизмов, таких как хелатирование железа и тем самым лишение микроорганизмов этого питательного вещества или прямое взаимодействие с компонентами поверхности бактерий [153]. Бактерицидное свойство ЛФ может также проявляться через прямое взаимодействие с поверхностью бактерий, с изменением проницаемости мембран, потерей клеточного содержимого [164, 214], с последующим лизисом, с высвобождением липополисахарида [158, 179], компонента внешней мембраны грамотрицательных бактерий [56]. У грамположительных бактерий механизм действия ЛФ иной: бактериальные мембраны разрушаются катионными остатками и гидрофобными остатками на N-конце [156]. ЛФ является богатым источником катионных и гидрофобных антимикробных пептидов, и несколько исследований показывают, что ЛФ может нейтрализовать эффект токсичности, вызванной липополисахаридами [163]. Взаимодействие ЛФ с липополисахаридами или с другими мембранными белками бактерий усиливает действие природных бактерицидов, таких как лизоцимы [128]. ЛФ также может модифицировать и разрушать факторы вирулентности посредством протеолиза [164]. Yen и др. продемонстрировали, что ЛФ является эффективным биоактивным белком в профилактике и лечении инфекций, вызванных патогенными микроорганизмами и штаммами бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [155]. Исследования *in vitro* подтвердили, что лактоферрин ингибирует образование биопленок и разрушает существующие биопленки [52, 214].

Биодоступность ЛФ *in vivo* низкая: контакт с протеолитическими ферментами приводит к образованию антимикробных пептидов, превосходящих по эффективности нативный лактоферрин [161].

Стабилизация молекул может быть достигнута путем включения ЛФ в биоматериалы на основе коллагена, гидрогели, липосомы, пористых микросфер или покрытия поверхностей различных типов имплантатов. ЛФ, обладая антиапоптотическим действием, может также модулировать миграцию, адгезию, пролиферацию и остеогенную дифференциацию клеток и мощно ингибировать остеокластогенез [190, 159]. ЛФ также вызывает активацию p42/44 MAPK-сигнализации в первичных остеобластах [152]. В работе Icriverzi и соавторов сообщается об остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойствах ЛФ и гидроксиапатита, «нагруженного» биорезорбируемым PEG-PCL [136]. Коллагеновые мембраны, обработанные ЛФ, также стимулируют и способствуют дифференцировке остеогенной линии клеток [111]. В эксперименте на крысах было доказано стимулирующее регенерацию костной ткани в области дефекта свода черепа действие гидрогеля из желатина, обработанного ЛФ [162].

В стволовых клетках, полученных из жировой ткани человека, ЛФ стимулируют синтез маркерных генов, связанных с остеогенной дифференцировкой [111]. Коллаген-лактоферриновые фибриллярные покрытия стимулируют пролиферацию и дифференцировку клеток и быстрое заживление кости [87]. В хирургически созданных костных дефектах желатиновые микросферы, нагруженные 3 мг бычьего лактоферрина в сочетании с неорганической бычьей костью, способствовали регенерации кости [109]. Способность ЛФ к дифференцировке остеобластов была также продемонстрирована с помощью теста на образование костных узелков. Результаты исследования Cornish et al. показали, что концентрация ЛФ более 100 мкг значительно увеличивала образование узелков и ускоряла минерализацию. В исследовании также изучалась возможность разработки рекомбинантного человеческого ЛФ (рчЛФ) в качестве биоматериала для доставки клеток [162].

Amini и Nair (2014) продемонстрировали антиапоптотическое действие рчЛФ на клетки преостеобластов MC3T3, механизм которого опосредован Wnt5a/РКА-путем. Они также разработали инъекционную матрицу из рекомбинантного человеческого лактоферрина (рчЛФ), которая поддерживает жизнеспособность, пролиферацию и дифференцировку клеток [51].

Montesi и др. (2015) показали, что биомиметические нанокристаллы гидроксиапатита обладают синергетическим действием на гомеостаз костной ткани, а также действуют как мощный анаболический фактор для остеогенной дифференциации и проявляют ингибиторный потенциал на образование и активность остеокластов [97]. Onishi и др. (2007) синтезировали хитозан-альгинат-Са микрочастицы, в которые они инкапсулировали ЛФ [184]. Эти микрокапсулы продемонстрировали лучшие противовоспалительные свойства по сравнению со свободным лактоферрином. Kılıc и др. (2017) впервые продемонстрировали потенциал многослойных микрокапсул с бычьим сывороточным альбумином, дубильной кислотой и ЛФ [125]. Shi и др. (2017) разработали два вида гидроксиапатита, конъюгированных с лактоферрином. Максимальная адсорбционная способность нано-гидроксиапатита выше, чем у микро-гидроксиапатита, что объясняется большей площадью поверхности нано-гидроксиапатита. Они показали, что лактоферрин на поверхности гидроксиапатита может улучшить биологическую активность гидроксиапатита [137]. Нанокристаллы гидроксиапатита были успешно использованы для изготовления костных скаффолдов, материалов для покрытия имплантатов и таргетных методов доставки лекарственных средств [202]. James и др. (2014) разработали биорезорбируемые гибридные полимерные нановолокнистые скаффолды, нагруженные человеческим рекомбинантным лактоферрином [147], которые продемонстрировали стимулирующий потенциал в отношении адгезии и пролиферации остеобластоподобных клеток MC3T3-E1. Многофункциональный характер ЛФ приписывают ряду производных пептидов, таких как лактоферрампин, лактоферрицин с доказанной эффективностью при наличии *Candida albicans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Исследования Bolscher и др. показали

слабое антимикробное свойство лактоферрамина и повышенную антимикробную эффективность лактоферрина [83]. Singh и др. (2002) продемонстрировали, что ЛФ предотвращает образование биопленок и разрушает существующие биопленки [43]. Они использовали *Ps. aeruginosa*, экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок (GFP), в камерах с непрерывным потоком культуры. В среде с ЛФ развитие биопленки было нарушено. Результаты исследования доказали бактерицидное и бактериостатическое действие ЛФ в отношении *Ps. Aeruginosa* [214].

Chen и др. (2017) продемонстрировали, что стеклянные поверхности, ковалентно связанные с лактоферрином или лактоферрином, могут нейтрализовать такие микроорганизмы, как *S. aureus* и *Ps. Aeruginosa* [55]. Fulgione и др. (2016) также изучали лечебный потенциал лактоферрина, доставленного биомиметическим гидроксипатитом при бактериальных инфекциях [154]. Stoleru и др. (2016) получили субстрат из поли(молочной кислоты) с помощью плазменного или гамма-облучения и провели дальнейшее связывание с лактоферрином путем ковалентной связи с использованием химии карбодиимида [160]. Этот комплекс проявил более высокую антиоксидантную, антимикробную и клеточно-пролиферативную активность. Jinkyu et al. (2020) разработали новые электросплетенные нановолокна, иммобилизованные лактоферрином, с помощью химии полидопамина с одновременным противовоспалительным действием и регенерацией кости [69].

Godoy-Gallardo и др. (2015) продемонстрировали, что иммобилизация пептида hLf1-11 (GRRRRSVQWCA) путем силанизации или введения полимерных щеток с помощью инициирования поверхности полимеризацией значительно снижает бактериальную адгезию и образование биопленок *Streptococcus sanguinis* и *Lactobacillus salivarius* [53, 214]. Costa и др. (2014) сообщили о ковалентной иммобилизации с помощью специфической ориентации через С-концевой цистеин пептида hLF1-11 на ультратонкие пленки хитозана. Введение хитозана с hLF1-11 обеспечивало связывание бактерий [79]. Возможные области применения чЛФ (1–11) — обработка поверхностей медицинских устройств в качестве неагрессивного биодезинфицирующего средства для подавления прилипания бактерий и

образования биопленок. Nagano-Takebe и др. (2014) показали, что адсорбированный человеческий ЛФ на биоматериале на основе титана ингибировал адгезию *Streptococcus gordonii*, а также проявлял бактерицидную активность [144]. Yoshinari и др. (2010) указали, что модификация поверхности Ti титансвязывающими пептидами (minTBP-1) и лактоферрицином приводит к снижению биоактивности *Porphyromonas gingivalis* [194].

## Резюме

Проведение эффективной направленной тканевой регенерации не представляется возможным с использованием только одного полимера, природного или синтетического, тогда как композиция или сочетание различных материалов имеет больший потенциал за счет аддитивного эффекта их отдельно взятых положительных свойств.

Высокие биоактивность и механическая прочность мембран являются основной целью современной науки в отношении улучшения свойств полимерных мембран, и именно в этом контексте — включение добавок.

Один из основных вопросов касается способности биоматериалов выделять антимикробные препараты в месте имплантации. Комбинации биоматериалов с ЛФ или другими типами АМП могут стать перспективным компонентом решения проблемы инфицирования костнопластических материалов бактериями со множественной лекарственной устойчивостью. Предложен широкий спектр соединений и технологических подходов, но для получения ожидаемого эффекта важно установить их биосовместимость, антимикробную эффективность и длительность в зоне интересе.

Таким образом, представляет интерес разработка и изучение эффективности резорбируемых мембран, в том числе с активными веществами, предотвращающими инфицирование раны, для применения в полости рта.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Разработка мембран и изучение их физических свойств

#### 2.1.1. Метод изготовления коллагеновых мембран из ахиллова сухожилия крупного рогатого скота

##### Экстракция коллагена

Свежезамороженные бычьи сухожилия были получены с сертифицированной по микробному контролю фермы. Сухожилия размораживали, очищали от лишней ткани и разрезали на кусочки толщиной 1 см. Затем кусочки сухожилий подвергали четырем обработкам по 12 часов 0,5 М NaCl, после чего их гомогенизировали в 0,83 М уксусной кислоты. В полученную суспензию добавляли пепсин (0,24 %), гидролиз протекал в течение 2 сут. Затем с помощью 1 М NaOH повышали pH до 7,5, чтобы остановить гидролиз, и суспензию коллагена осаждали 12 % раствором NaCl. Образовавшийся осадок коллагена повторно растворяли в 0,83 М уксусной кислоты и подвергали диализу против 0,5 М уксусной кислоты в течение 3 сут., ежедневно меняя диализирующий раствор. Конечную концентрацию коллагена в суспензии определяли гравиметрическим анализом [1].

##### Электроосаждение

Коллагеновую матрицу получали при помощи электроосаждения (Рисунок 1 А). Для этого использовали суспензию коллагена 5 мг/мл. Осаждение проводили в электрохимической ячейке, разделенной полупроницаемым барьером из регенерированной целлюлозы (Sigma-Aldrich) на две части, каждая из которых содержала либо анод, либо катод. В анодную часть ячейки заливали суспензию коллагена, а в катодную часть ячейки заливали дистиллированную воду. Катод и анод представляли собой пластинчатые электроды, к которым подключали

источник постоянного тока напряжением 60 В, и проводили процесс электроосаждения. Полученные мембраны осторожно отделяли от поверхности полупроницаемого барьера и обрабатывали в течение 20 минут изопропиловым спиртом, а затем сушили в ламинарном шкафу [1].

### **Персонализация**

Создание персонализированных форм достигали за счет регулируемой химической сшивки мембран (в фосфатном буфере), механической перфорации с одной или двух сторон при помощи ролика с валиком, содержащем иглы длиной 1,5 мм, а также лиофилизации при полученных мембран при 40 °С в течение 24 часов (Рисунок 1 Б). За счет комбинирования методов сшивки, механической перфорации и лиофилизации получали три различные персонализированные формы коллагеновой матрицы: мембрана, губка, интерфейс.

Для проведения дальнейшей экспериментальной работы по направлению «Стоматология» была выбрана персонализированная форма коллагеновой матрицы — «Интерфейс», именуемая в тексте аннотации и аспирантской работы как «мембрана» (не стоит путать с персонализированной формой «Мембрана»).

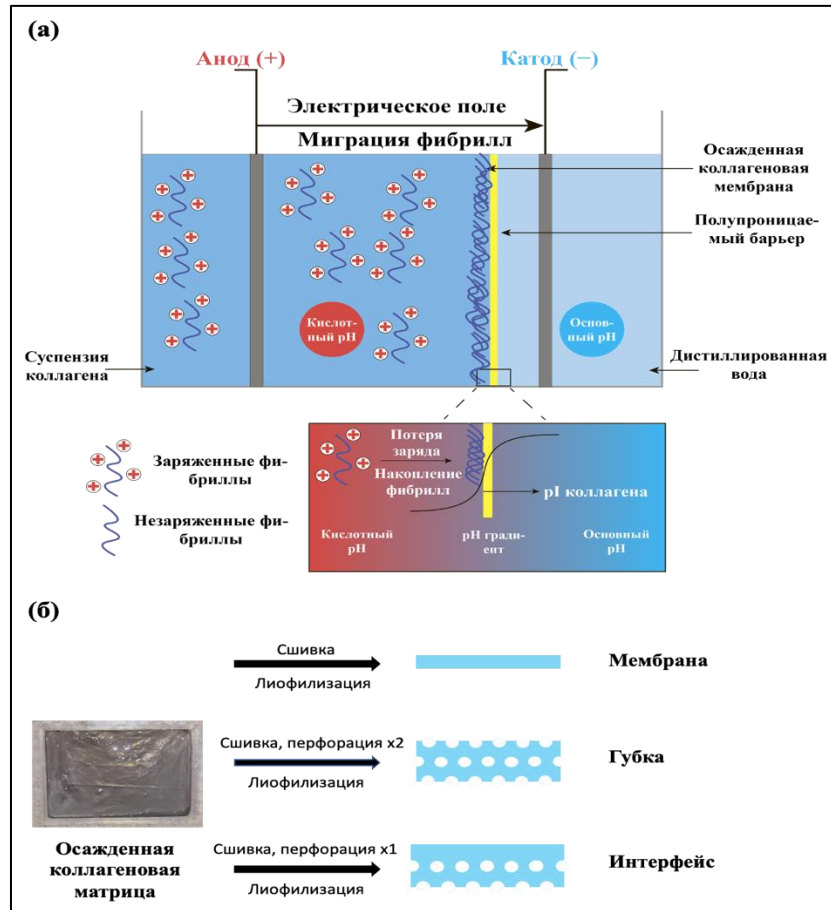


Рисунок 1 — Схема получения коллагеновых матриц. А) Процесс электроосаждения коллагеновых матриц на полупроницаемом барьере.

Б) Постобработка коллагеновых матриц с целью получения персонализированных форм: мембраны, губки, интерфейса. Для направления «Стоматология» была выбрана форма — губка (Рисунок 2)

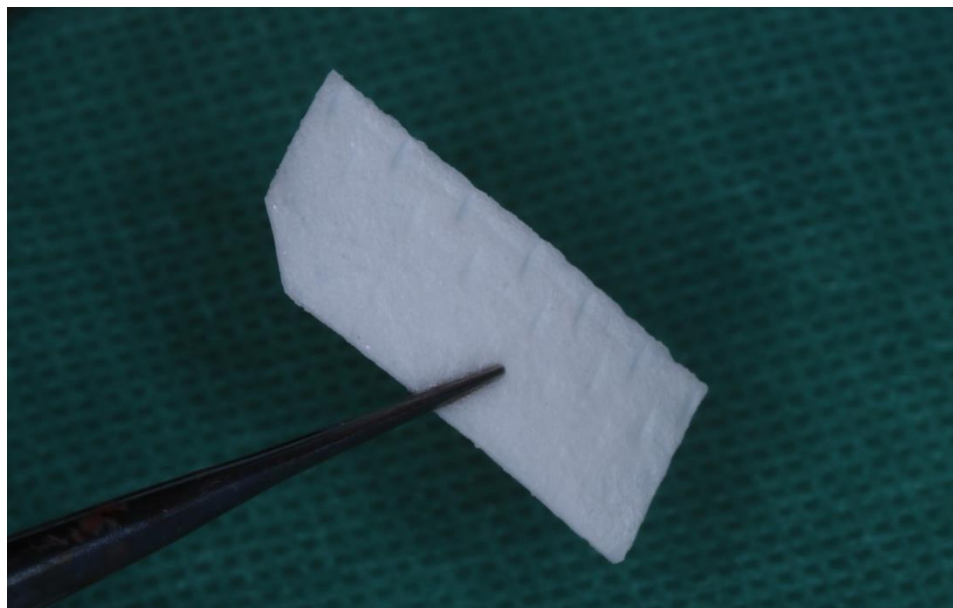


Рисунок 2 — Персонализированная коллагеновая мембрана на основе ахиллова сухожилия крупного рогатого скота

## 2.1.2. Изучение свойств полученных мембран

### Изучение физических свойств полученных мембран

Визуализацию микроструктуры персонализированного коллагена проводили на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) EVO LS10 (Zeiss, Германия) в режиме низкого вакуума (ЭП, 70 Па), наблюдения проводили при ускоряющем напряжении 21 кВ и токе на образец 40–70 пА, используя детектор обратно-рассеянных (отраженных) электронов (BSE). При подготовке образцов для исследования их промывали физиологическим раствором и дистиллированной водой, разрезали лезвием микротомы, сушили на воздухе и помещали в камеру сканирующего электронного микроскопа [1].

Механические свойства персонализированного коллагена тестировали во влажных условиях с использованием системы микромеханических испытаний Mach-1 v500csst (Biomomentum Inc., Лаваль, Квебек, Канада). Влажное тестирование образцов проводили после их ночной инкубации с PBS (фосфатно-солевой буфер) при 4 °С. Предел прочности при растяжении, деформация при разрушении и модуль упругости (модуль Юнга, рассчитанный на линейном участке кривой напряжения-деформации) измеряли в режиме одноосного растяжения не менее чем для пяти прямоугольных образцов размером 30×5 мм. Одноосное растяжение выполняли со скоростью 0,1 мм/с до разрушения. Параметры рассчитывали по кривым деформации в соответствии с протоколом производителя [1].

ИК-Фурье-анализ коллагеновых мембран проводили с использованием ИК-Фурье-спектрометра Spectrum Two (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США), и данные собирали в спектральном диапазоне 4000–500 см<sup>-1</sup> при разрешении 0,5 см<sup>-1</sup>. Все спектры изначально были получены в режиме поглощения и преобразованы в режим пропускания ИК. Спектры коллагена нормализовали, используя интенсивность полосы амида I в качестве внутреннего стандарта [1].

Для измерения набухания высушенные образцы коллагеновых мембран сначала взвешивали, затем помещали в PBS при 4 °С на ночь. Затем образцы зажимали между двумя листами фильтровальной бумаги для удаления лишней влаги и снова взвешивали. Степень набухания выражали как изменение (в процентах) массы образцов мембран (влажных и сухих) по формуле [1]:

$$S = \frac{m_w - m_d}{m_d} \times 100 \%$$

где  $S$  — степень набухания,  $m_w$  — масса влажного образца,  $m_d$  — масса сухого образца.

Измерения температуры усадки, по которым также оценивают степень сшивания коллагена, проводили гидротермическим методом с использованием лабораторного прибора. Для этого полоски мембран размером 20×3 мм помещали в стеклянную пробирку, которую, в свою очередь, погружали в водяную баню с дистиллированной водой. Температуру водяной бани повышали примерно на 5 °С/мин. Температуру, при которой наблюдалась усадка, для большей точности регистрировали двумя термометрами разных моделей.

Измерения температуры сваривания, по которым также оценивают степень сшивания коллагена, проводили гидротермическим методом с использованием лабораторного прибора. Для этого полоски коллагена размером 20×3 мм помещали в стеклянную пробирку, которую, в свою очередь, погружали в водяную баню с дистиллированной водой. Температуру водяной бани повышали примерно на 5 °С/мин. Температуру, при которой наблюдалось сваривание, для большей точности регистрировали двумя термометрами разных моделей [1].

### **Изучение биологических свойств полученных мембран *in vitro***

Для измерения не прямой цитотоксичности анализ *in vitro* с аламаровым синим, адаптированный из ISO 10993, проводили для измерения влияния экстрактов образцов электроосажденных персонализированных коллагеновых матриц на метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток из

пуповины. Для получения экстрактов образцы матриц (три кусочка по 1 см<sup>2</sup>) тонко измельчали и инкубировали в 1 мл культуральной среды в течение 24 часов при 37 °С. Способность клеток восстанавливать резазурин до резорурфина под действием митохондриальных ферментов измерялась как индикатор их жизнеспособности. Серийные разведения экстрактов в DMEM/F12 питательной среде с добавлением 100 Ед/мл стрептомицина, 100 г/мл пенициллина, 1 % (об./об.) GlutaMAX (Gibco), 5 % (об./об.) фетальной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone), положительный контроль (додецилсульфат натрия, SDS) и отрицательный контроль (только культуральная среда) в трех повторностях (100 мкл) были добавлены к субконфлюэнтному монослою МСК в 96-луночном планшете. Дальнейшую инкубацию проводили при температуре 37 °С в течение 2 часов. Измерения флуоресценции проводили на спектрофлуориметре VictorNivo (Perkinelmer, США) при длине волны возбуждения 580/20 нм и эмиссии 625/30 нм.

Для измерения количества ДНК в образцах после аламарового синего лунки 3 раза промывали PBS, в каждую лунку добавляли дистиллированную воду и проводили 3 цикла замораживания-оттаивания (по 30 минут) для получения лизата клеток. Далее в соотношении 1:1 к лизату добавляли раствор PicoGreen (приготовленный в соответствии с рекомендациями производителя) и инкубировали 5 минут в темноте. Измерения проводили на спектрофлуориметре VictorNivo (Perkinelmer, США) в режиме флуоресценции (возбуждение 480/30 нм, эмиссия 530/30 нм) [21].

Для проведения теста прямой цитотоксичности использовалось два типа клеток — NIH 3T3 и МСК из пуповины. Поверхности персонализированного коллагена заселялись обеими типами клеток в концентрации  $3 \times 10^4/\text{см}^2$  и инкубировались в течение 6 дней. Для визуализации жизнеспособности клеток на коллагеновых пленках проводили окраску живых и мертвых клеток (Live/Dead assay). Живые клетки окрашивали кальцеином 0,5 мг/мл (Calcein-AM, Sigma-Aldrich, Германия), мертвые — йодидом пропидия 1,5 мкМ (ThermoFisher Scientific, США), также были докрашены ядра (0,004 мг/мл Hoechst 33258, Thermo Scientific, США). Окраску конструкторов проводили в течение 30 мин. при

температуре 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Затем образцы отмывали средой DMEM/F12 (1:1, БиолоТ, Россия) 3 раза и анализировали с применением лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 880 (Zeiss, Германия) с использованием для возбуждения лазеров с длинами волн 405, 488 и 594 нм [1].

## **2.2. Экспериментальное исследование *in vivo* (на лабораторных животных)**

С целью изучения биологических свойств разработанных мембран для устранения дефекта мягких тканей в полости рта было проведено экспериментальное исследование на лабораторных животных (кролики) на базе Центрального Вивария ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет) [6].

### **2.2.1. Характеристика лабораторных животных и условия их содержания**

В исследование включено 12 лабораторных животных — половозрелых самцов кроликов породы «Советская шиншилла» весом 3–3,5 кг.

Количество животных было рассчитано по формуле объема выборки с учетом ранее проведенных исследований по данным литературных источников, в которых предполагаемый уровень эффекта был показан как статистически значимый (n=6). Эксперимент был проведен согласно требованиям Хельсинской декларации и одобрен локальной Комиссией по биоэтике Сеченовского Университета (протокол № 06–23 от 06.04.2023 г.).

### **Источник получения животных**

Научно-производственная база ФГБУ «ВГНКИ» «Манихино».

## **Карантин/Акклиматизация**

После поступления животных содержали в карантине 10 суток.

### **Клетки для содержания животных**

Животных содержали в решетчатых клетках размером 745x795x795 мм, площадью 5 923 см<sup>2</sup> в стеллажах AWTech Евразия Плюс с кормушкой, поилкой и стальными держателями этикеток. Количество животных в одной клетке — 1 особь. На одном стеллаже находились три индивидуальные клетки. Мероприятия по уборке поддонов клеток проводились ежедневно. Полная дезинфекция клеток проводилась при поступлении животных в эксперимент и после выведения их из эксперимента.

### **Условия содержания животных**

Во время эксперимента животных содержали в контролируемых условиях:

- температура окружающего воздуха 15–21 °С;
- относительная влажность не ниже 45 %;
- смена светового периода (08:00–20:00 — день, 20:00–08:00 — ночь).

### **Корм и вода**

Пищевой рацион состоял из полнорационного комбикорма «К-122» № 275 (ООО «Лабораторкорм»). Животные получали воду из центрального водопровода (соответствующую СанПиН 2.1.3684-21) и имели свободный доступ к корму и воде.

В послеоперационном периоде первые 7 суток животные получали такой же корм, но в размоченном состоянии до достижения мягкой консистенции с целью профилактики травмирования послеоперационной области.

## 2.2.2. Дизайн исследования

У всех животных на верхней челюсти и твердом небе выделяли 2 группы исследования в зависимости от техники операции и применения мембраны. Распределение представлено в Таблице 1.

### Группа 1 (n=6 кроликов)

Всем животным на слизистой оболочке рта в области твердого неба и фронтальной группы зубов (по типу вестибулопластики на верхней челюсти) слева и справа от средней линии сформированы симметричные дефекты размером по 0,5 см. Заживление слева (группа исследования) осуществлялось при использовании биорезорбируемых мембран из персонализированного коллагена, дефекты справа (группа сравнения) заживали вторичным натяжением (Рисунок 3).

Таблица 1 — Распределение по группам сторон верхней челюсти лабораторных животных в зависимости от техники операции и применения коллагеновых мембран

Область операции	Группа, количество животных (n=12)			
	1	2	3	4
Верхняя челюсть, правая сторона	Вторичное заживление (n=3)	Коллаген+ лактоферрин (n=3)	Коллаген (n=3)	Коллаген+ лактоферрин (n=3)
Верхняя челюсть, левая сторона	Коллаген (n=3)	Вторичное заживление (n=3)	Mucograft (n=3)	Mucograft (n=3)
Твердое небо (проксимальная часть, у резцов)	Коллаген (n=3)	Коллаген+ лактоферрин (n=3)	Коллаген (n=3)	Коллаген+ лактоферрин (n=3)
Твердое небо (дистальная часть)	Вторичное заживление (n=3)	Вторичное заживление (n=3)	Mucograft (n=3)	Mucograft (n=3)

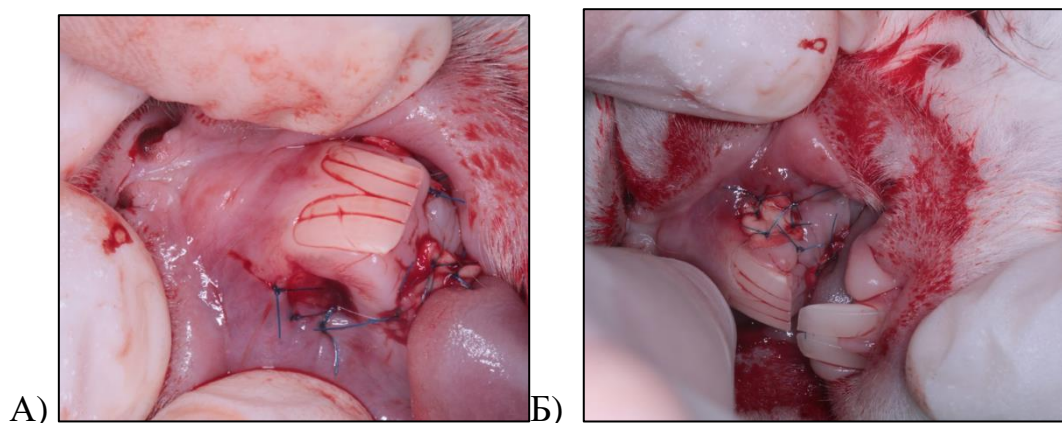


Рисунок 3 — Группа 1: А) справа — заживление раны вторичным натяжением;  
 Б) слева — рана закрыта персонализированным коллагеном

### Группа 2 (n=6 кроликов)

Всем животным на слизистой оболочке рта в области твердого неба и фронтальной группы зубов (по типу вестибулопластики на верхней челюсти) слева и справа от средней линии сформированы симметричные дефекты квадратной формы размером 0,5 см на 0,5 см. Заживление слева (группа исследования) осуществлялось при использовании биорезорбируемых мембран из персонализированного коллагена с лактоферрином, дефекты справа (группа сравнения) заживали вторичным натяжением (Рисунок 4).

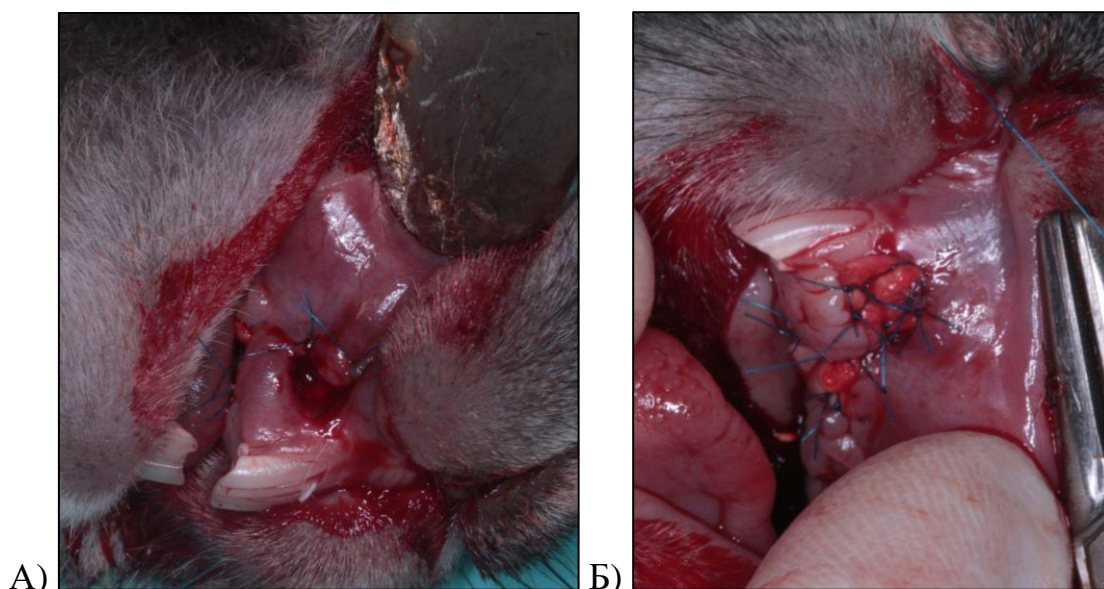


Рисунок 4 — Правая (заживление вторичным натяжением) (А) и левая (персонализированный коллаген с лактоферрином) (Б) сторона у экспериментального животного группы 2 во время операции

### Группа 3 (n=6) кроликов

Всем животным на слизистой оболочке рта в области твердого неба и фронтальной группы зубов (по типу вестибулопластики на верхней челюсти) слева и справа от средней линии сформированы симметричные дефекты размером по 0,5 см. Заживление слева (группа исследования) осуществлялось при использовании коллагенового матрикса Mucograft, дефекты справа (группа сравнения) заживали при использовании коллагенового матрикса (Рисунок 5).

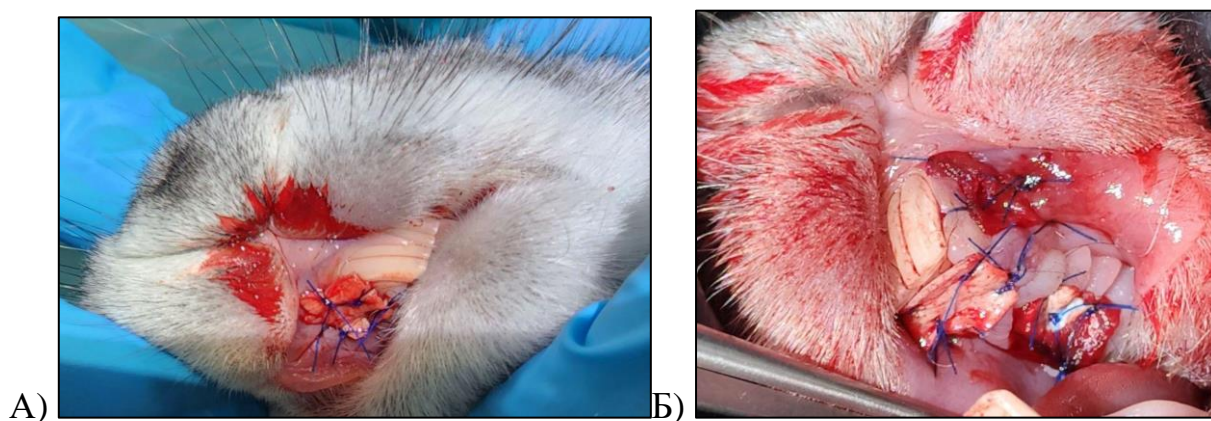


Рисунок 5 — Правая (ПерсКоллаген) (А) и левая (Mucograft) (Б) сторона у экспериментального животного группы 3 во время операции

### **Группа 4 (n=6)**

Данную выделяли среди групп, в которых применяли разработанные коллагеновые мембраны с лактоферрином (справа на верхней челюсти) и коллагеновый матрикс Mucograft на противоположной от них стороне (преддверие) (слева на верхней челюсти) или с отступом не менее 1 см от них (твердое небо).

Выведение каждого животного из эксперимента проводили на 14-е сутки после операции по забору соединительнотканного аутотрансплантата и проведения вестибулопластики путем передозировки внутримышечного наркоза «Золетил» (15 мг/кг) и «Ксила» (0,6 мл/кг) [6].

Степень выраженности отека и гиперемии оценивали в условных баллах от первоначальной ситуации (объема мягких тканей в проекции области операции): 0 — отсутствие проявления признака (отека и гиперемии), 1 — незначительный отек или незначительная гиперемия слизистой оболочки рта, 2 — умеренный отек мягких тканей или умеренная гиперемия, 3 — выраженный отек или выраженная гиперемия.

Оценку регенерации проводили в процентах от общей площади дефекта с помощью измерения градуированным пародонтальным зондом, линейки и штангенциркуля. С учетом создания дефектов одинакового размера сравнительный анализ в процентах был правомочен.

Послеоперационный контроль осуществляли на 3, 5, 7 и 14 сутки — наиболее информативные для оценки регенерации мягких тканей в полости рта.

#### **2.2.3. Гистологическое исследование биоптатов челюстей кроликов**

После выведения животных из эксперимента проводили вырезку мягких тканей с углублением до кости верхней челюсти размерами 1,5x1,5 см с отступом от контрольных точек (резцов правой и левой стороны верхней челюсти, для твердого неба — отступив от внутренней поверхности резцов). Полученные фрагменты помещали в 10 % раствор формалина.

Фиксированные в 10 % нейтральном забуференном формалине ткани заливали в парафиновые блоки в строгой ориентации, обеспечивающей получение срезов в перпендикулярной поверхности неба или десны плоскости. Срезы толщиной 3–4 микрометра окрашивали гематоксилином и эозином и трихромом по Маллори. Образцы были изучены методом стандартной оптической микроскопии с помощью универсального микроскопа LEICA DM4000 B, оснащенного видеокамерой LEICA DFC7000 T и программным обеспечением LAS V4.8 (Leica Microsystems, Германия) [35].

В каждом препарате оценивали признаки воспаления (экссудация, инфильтрация иммунными клетками, микроциркуляторные нарушения) и регенерации (неоангиогенез, пролиферация фибробластов, зрелость грануляционной ткани) по 4-балльной шкале (Таблицы 2–7) [35].

Для иммуногистохимического исследования срезы образцов тканей, фиксированные в 10 % нейтральном забуференном формалине и залитые в парафиновые блоки толщиной 3–4 микрометра депарафинизировали и инкубировали с 3 % перекисью водорода в течение 10 минут. Неспецифическое окрашивание предотвращали блокирующим раствором (Cell Marque, США) и инкубировали с мышинными моноклональными первичными антителами против  $\alpha$ -гладкомышечного актина, или  $\alpha$ -SMA (A2547, Merck, США, разведение 1:400). Визуализацию проводили с помощью вторичных козых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (G-21040, Invitrogen, США, разведение 1:1000) и диаминобензидином (DAB) с контрастным окрашиванием гематоксилином. Экспрессия  $\alpha$ -SMA в участках имплантации оценивалась с помощью полуколичественной системы (Таблица 8) [35].

Таблица 2 — Балльная система оценки морфологических признаков экссудации в участке имплантации

Баллы	Морфологические признаки
0	Отсутствие признаков экссудации

Продолжение Таблицы 2

1	Слабые признаки отека, в межклеточном пространстве небольшое количество жидкости
2	Умеренные признаки отека ткани, в межклеточном пространстве среднее количество жидкости
3	Выраженный отек ткани, в межклеточном пространстве значительное количество жидкости

Таблица 3 — Балльная система оценки морфологических признаков воспалительной инфильтрации в участке имплантации

<b>Баллы</b>	<b>Морфологические признаки</b>
0	Отсутствие признаков воспаления
1	Присутствие единичных воспалительных клеток в инфильтрате (менее 10 шт. в 1 поле зрения при увеличении x400)
2	Умеренное количество воспалительных клеток в инфильтрате (менее от 11 до 29 шт. в 1 поле зрения при увеличении x400)
3	Большое количество воспалительных клеток в инфильтрате (более 30 шт. в 1 поле зрения при увеличении x400)

Таблица 4 — Балльная система оценки морфологических признаков микроциркуляторных нарушений в участке имплантации

<b>Баллы</b>	<b>Морфологические признаки</b>
0	Отсутствие признаков нарушения микроциркуляции
1	Краевое стояние (пристеночное) стояние эритроцитов в просвете сосудов
2	Начальные проявления агрегации и агглютинации эритроцитов в просвете сосудов
3	Стазы и сладжи эритроцитов в просвете сосудов

Таблица 5 — Балльная система оценки морфологических признаков неоангиогенеза в участке имплантации

<b>Баллы</b>	<b>Морфологические признаки</b>
0	Нет признаков формирования сосудов
1	Начало формирования сосудов: сосудистая стенка отсутствует, эндотелий представлен тонким слоем эндотелиоцитов
2	Продолжение формирования сосудов: t. Adventitia отсутствует, мышечные волокна в t. Media тонкие, эндотелий обычного строения
3	Сосуды полностью сформированы: стенка имеет 3-х слойное строение (t. Adventitia, Media, Intima), эндотелий обычного строения

Таблица 6 — Балльная система оценки морфологических признаков пролиферации фибробластов в участке имплантации

<b>Баллы</b>	<b>Морфологические признаки</b>
0	Отсутствие признаков пролиферации фибробластов
1	Слабо выраженные гипертрофия и гиперплазия фибробластов, увеличение их объема менее чем на 10 %
2	Умеренные признаки гипертрофии и гиперплазии фибробластов, увеличение их объема на 20–30 %
3	Выраженные признаки гипертрофии и гиперплазии фибробластов, увеличение их объема более чем на 30 %

Таблица 7 — Балльная система оценки морфологических признаков зрелости грануляционной ткани в участке имплантации

<b>Баллы</b>	<b>Морфологические признаки</b>
0	Грануляционная ткань отсутствует
1	Присутствует юная грануляционная ткань с обильными признаками васкуляризации
2	В грануляционной ткани присутствуют тонкие пучки соединительнотканых волокон, сосуды в небольшом количестве
3	Грануляционная ткань практически отсутствует, на ее месте имеется сформированная соединительная ткань

Таблица 8 — Балльная система оценки экспрессии антител против  $\alpha$ -SMA

<b>Баллы</b>	<b>Экспрессия <math>\alpha</math>-SMA</b>
-	Экспрессия отсутствует
+	Отдельные позитивно окрашенные клетки
++	Небольшое количество позитивно окрашенных клеток (менее 19 на 1 поле зрения при увеличении 400)
+++	Значительное количество позитивно окрашенных клеток (более 20 на 1 поле зрения при увеличении 400)

### **2.3. Микробиологическое исследование адгезии микроорганизмов полости рта к коллагеновым мембранам**

Сравнительный анализ микробного роста на поверхности полученных коллагеновых мембран проводили при «заселении» их поверхности штаммами

условно-патогенных микроорганизмов полости рта. В качестве контроля для исследования применяли коллагеновый матрикс Mucograft (Geistlich Pharma AG, Швейцария), представляющий собой матрикс из высокоочищенного свиного коллагена I и III типа без поперечных связей. Материал состоит из двух слоев: плотного, который обеспечивает стабильность материала в условиях открытого заживления, и губчатого, который стабилизирует кровяной сгусток и обеспечивает врастание клеток.

Микробиологическое исследование было выполнено на базе «НИИВС им. И. И. Мечникова». На предварительном этапе было выполнено исследование состава микроорганизмов полости рта. По результатам исследования проб из полости рта наиболее часто и в большом объеме выделяли различные виды стрептококков, стафилококков, а также грибы рода *Candida*. Для проведения экспериментов были выбраны *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* как наиболее клинически значимые. По этой причине в исследования были включены штаммы микроорганизмов из Уникальной научной установки «Коллекция НИИВС им. И. И. Мечникова».

Получение видовых биопленок проводили по следующему протоколу. Для моделирования естественных условий, то есть для лучшей адгезии микроорганизмов, мембраны выдерживали 4 часа в пастеризованной слюне на шейкере при комнатной температуре. Сбор слюны осуществляли натошак путем сплевывания в стерильную центрифужную пробирку. В сборе слюны участвовали 6 сотрудников лаборатории микробиологии условно-патогенных бактерий в возрасте 20–60 лет. В исследовании использовали слюну, собранную в день ее использования. Слюну центрифугировали 4 000 об/мин в течение 15 мин. при температуре 4 °С. Полученный супернатант подвергали пастеризации при 65 °С в течение 20 мин. Пастеризованную слюну повторно центрифугировали и пастеризовали при аналогичных условиях. Эффективность пастеризации контролировали путем прямого посева на колумбийский агар с добавлением дефибринированной крови.

Получение суспензии микроорганизма проводили по единому протоколу для всех микроорганизмов: ампулу с лиофилизированным штаммом вскрывали в асептических условиях. Для растворения содержимого ампулы в нее вносили 0,5 мл стерильного сердечно-мозгового бульона. Полученную микробную суспензию переносили в пробирку с 2 мл сердечно-мозгового бульона и подращивали в течение 2-х часов в термостате при температуре 37 °С. Для восстановления полной жизнеспособности выполняли два пассажа на питательном агаре с добавлением лошадиной крови до 5 %. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в 5 % среде CO<sub>2</sub>. Полученную чистую культуру идентифицировали до вида с использованием масс-спектрометрического метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (англ. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) с времяпролетным разделением (MALDI-ToF-MS). Суспензию необходимой плотности получали путем смыва с плотной питательной среды с последующим денситометрическим контролем (0,8 Ед.МсF). Количество образцов мембраны для создания биопленок 1 вида микроорганизма было равно 18.

Исследование образовавшихся биопленок на поверхности мембран выполняли на 3, 5, 7 сутки. В исследовании изучали мембраны трех видов: 2 полученные на базе Сеченовского Университета (коллагеновую мембрану и коллагеновую мембрану с лактоферрином) и 1 в качестве контроля — коллагеновый матрикс Mucograft.

Для получения биопленок исследуемую мембрану размером 0,5x1,0 см помещали в пробирку, содержащую 0,5 мл пастеризованной слюны, время экспозиции составляло 4 часа при комнатной температуре.

Слюну удаляли вакуумным аспиратором, погружая наконечник на дно пробирки. Приготовленный инокулюм, содержащий питательную среду и микроорганизм, вносили по 1 мл в каждую пробирку с исследуемым образцом мембраны. Пробирки помещали на площадку шейкера с изменяющимся наклоном поверхности при температуре 37 °С и экспозиции 16 часов.

Ежедневно реакционную смесь извлекали из пробирок с помощью аспиратора до полного осушения. Во все пробирки автоматической пипеткой

вносили по 1 мл инокулюма с соответствующим микроорганизмом. Описанный цикл повторяли в течение семи суток.

Контроль образования биопленок осуществляли визуально и готовили препараты — мазки с окраской по Граму. Таким образом, все исследуемые образцы разделили на 4 группы по 3 образца в каждой: 1-я (контрольная), в которой анализировали характер роста бактерий без их помещения на поверхность коллагеновой мембраны; 2-я — микробный рост на поверхности персонализированной коллагеновой мембраны; 3-я — рост бактерий на поверхности коллагеновой мембраны с лактоферрином; 4-я (сравнения) — микробный рост на поверхности коллагенового матрикса Mucograft.

### Процедура анализа

Анализ результатов проводили на 3, 5 и 7 сутки. Для этого стерильным пинцетом мембрану переносили в пробирку с 1 мл деионизированной воды при экспозиции 5 минут. Отмытую таким образом мембрану переносили в пробирку с 500 мкл 10 % сахарозы и подвергали активному перемешиванию на вортексе в течение 1 минуты, 20 мкл образовавшейся суспензии отбирали для приготовления серийных разведений с целью определения количества жизнеспособных бактерий и сразу приступали к измерению рН. Временные точки измерения были: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 мин. По завершению исследования электрод отмывали и описанную процедуру повторяли в отношении следующего образца мембраны.

В отношении контрольной пробы с микроорганизмами (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*) после 7 суток эксперимента аналогично мембранам была произведена оценка влияния 20 мкл среды культивирования и контроля выращивания (суточный инокулем без мембраны) на рН 10 % раствора сахарозы (Рисунок 6).

По завершению исследования все изучаемые жидкости и одноразовые материалы были обеззаражены в соответствии со стандартной операционной процедурой в отношении отходов класса Б.

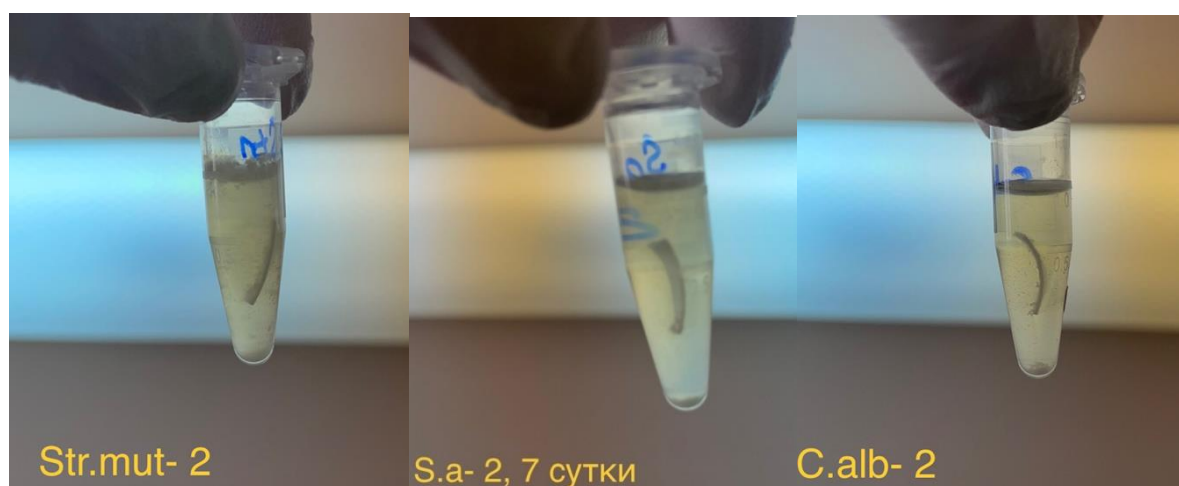


Рисунок 6 — Оценка активности микроорганизмов на поверхности коллагеновых мембран

#### 2.4. Статистическая обработка данных

При проведении эксперимента на животных полученные данные обрабатывали с помощью программ STATISTICA для IOS и Microsoft Office Excel 2019. Количественные параметры представили в виде среднего арифметического стандартного отклонения среднего значения, медианы (Me) и интерквартильного размаха (ИКР). Сравнительный анализ количественных показателей между двумя группами провели с помощью параметрических (критерий Т-Стьюдента, Критерий Фишера) или непараметрических (Манна-Уитни, Краскала-Уоллиса) показателей после проверки нормальности распределения выборок (Критерий Шапиро-Уилкса). Изменения внутри одной группы в динамике оформили с помощью критерии Уилкокса. Результаты исследования считали статистически значимыми при достоверности более 95 % ( $p < 0,05$ ).

Статистическую обработку данных, полученных по результатам морфологического исследования, осуществляли с помощью программы GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software, США). Сравнительный анализ между группами после определения нормальности распределения выборок проводили с помощью критерия Краскала-Уоллиса и коррекции критерием Данна для множественного сравнения. Статистические значимыми результаты считали при достоверности не

менее 95 %. Плотность сосудов оценивали на увеличении  $\times 200$  в 5 репрезентативных полях зрения. Результаты анализа плотности сосудов определяли как средние значения в расчете на  $1\text{мм}^2$ .

При изучении микробного роста на поверхности коллагеновых мембран для количественных признаков проводили определение средних значений, стандартных отклонений и медиан. Сравнение между группами проводили с помощью критерия Краскелла-Уоллиса (в связи с ненормальным распределением выборок по критерию Шапиро-Уилкса), статистически значимыми результаты считали при достоверности более 95 % ( $p < 0,05$ ).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Результаты изучения свойств разработанных мембран

#### Характеристика суспензии коллагена

Извлеченная суспензия коллагена состояла из плотно переплетенных фибрилл с нормальной и зигзагообразной морфологией. Обе морфологии сохранили D-периодичность, последняя содержала оболочку из нескрученных субфибрилярных структур. Медиана длины фибрилл составила 158 (26; 470) мкм, а медиана диаметра — 292 (117; 667) нм (Рисунок 7 Д, Е). Анализ SDS-PAGE извлеченных образцов коллагена выявил наличие двух полос, соответствующих цепям  $\alpha 1$  (I) (~137 кДа) и  $\alpha 2$  (I) (~125 кДа) (Рисунок 8). Кроме того, была определена изоэлектрическая точка коллагена при pH ~5,6 на основе изменения  $\zeta$ -потенциала при различных значениях pH (Рисунок 9) [1].

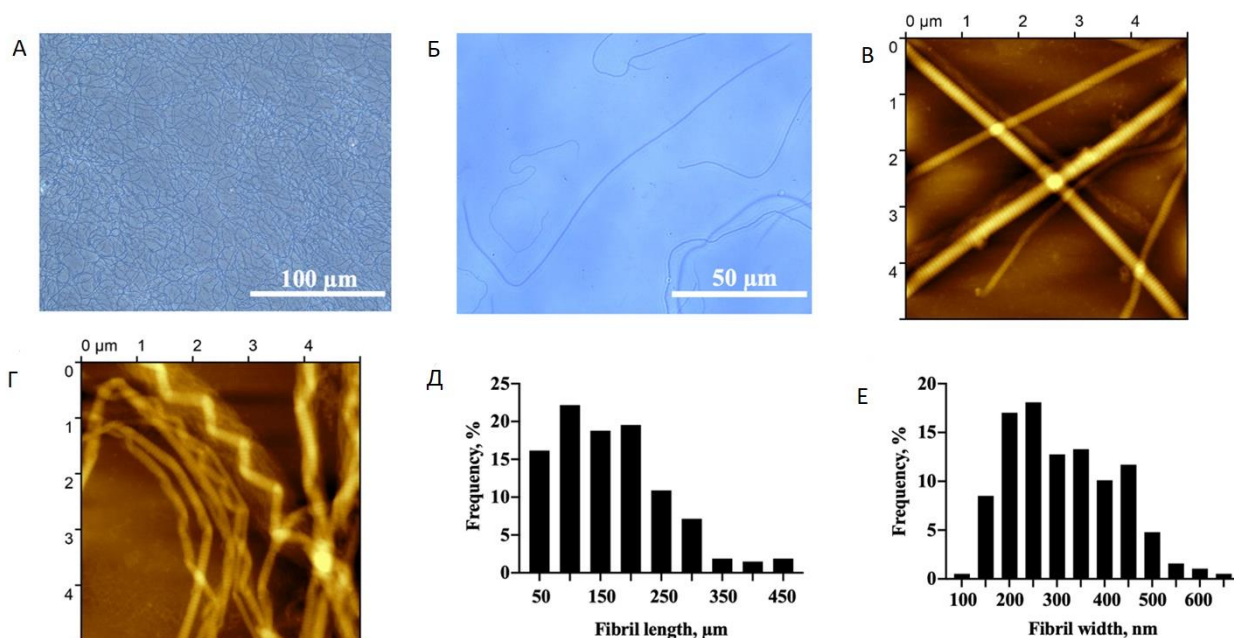


Рисунок 7 — Фибриллярная структура коллагена. А) Общий вид при фазово-контрастной микроскопии. Б) Детальное изображение. В, Г) Вид волокон при исследовании АСМ. Д, Е) Показатели длины и ширины коллагеновых фибрилл в суспензии

Коллаген I типа является наиболее распространенной формой коллагенов, молекула которого состоит из двух равных цепей  $\alpha 1$  (~139 кДа), связанных с помощью водородных взаимодействий с третьей цепью  $\alpha 2$  (~129 кДа), имеющей другую аминокислотную последовательность. Выделенные образцы коллагена были подвергнуты электрофорезу для проверки их соответствия вышеуказанной структуре (Рисунок 8). Электрофоретический анализ выявил на агарозном геле наличие двух полос, соответствующих цепям  $\alpha 1$  (I) (~130 кДа) и  $\alpha 2$  (I) (~110 кДа), типичных для коллагена типа I [1].

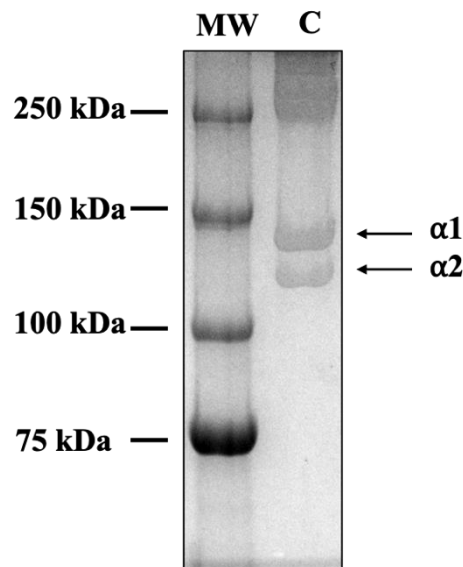


Рисунок 8 — Электрофоретическая картина извлеченного коллагена. Образцы (С) окрашивали красителем Кумасси синим и сравнивали с образцами стандартной массы (MW)

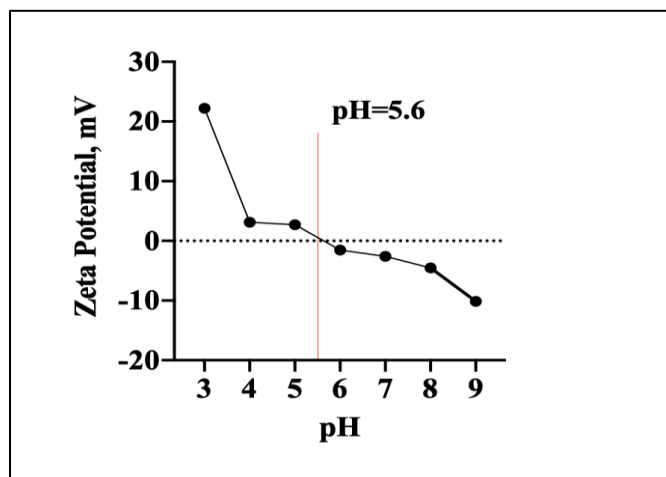


Рисунок 9 — Дзета-потенциал извлеченного коллагена, равный ~5,6

## Характеристика персонализированного коллагена

До этапа персонализации коллагена полученные в результате электроосаждения коллагеновые матрицы были исследованы при помощи ИК-спектроскопии (Рисунок 10) для доказательства безопасности метода электроосаждения с точки зрения сохранения химической структуры коллагена. Высушенные на воздухе мембраны (контроль) и электроосажденные матрицы не имели различий. ИК-спектры показали типичные полосы для коллагена I типа с пиками амида I при  $1634\text{ см}^{-1}$  (растяжение C=O), амида II при  $1547\text{ см}^{-1}$  (изгиб NH), амида III при  $1238\text{ см}^{-1}$  (изгибание NH), амида A (растяжение NH) при  $3203\text{ см}^{-1}$  и амида B при  $2970\text{ см}^{-1}$  (растяжение C-H).

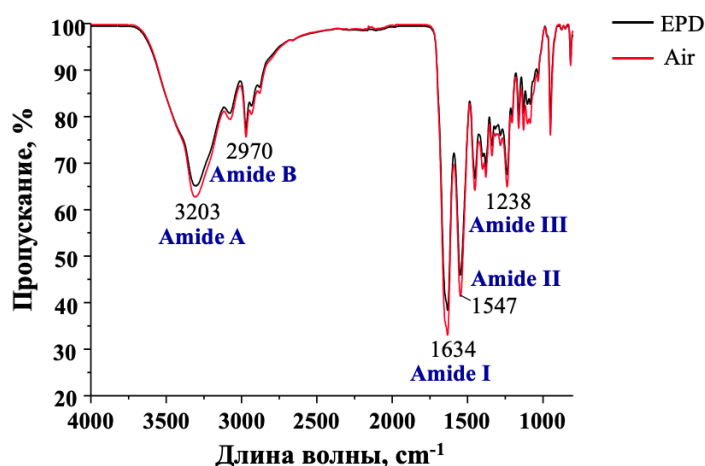


Рисунок 10 — ИК-спектр электроосажденных коллагеновых матриц (EPD) и пленок, высушенных на воздухе (контрольные образцы, Air)

После персонализации все три формы персонализированного коллагена сравнивали между собой (мембрана, губка, интерфейс). Результаты измерения толщины, набухаемости и температуры сваривания персонализированного коллагена представлены в Таблице 9. Ожидается, что мембрана, обладающая непористой структурой, была самой тонкой по сравнению с губчатой и интерфейсной формами, которые имели одинаковую сухую толщину. Набухаемость мембраны была также ниже губки и интерфейса, поскольку последние 2 формы обладают пористой структурой, в которой при набухании

скапливается вода, и их степень набухания была в 2 раза выше, чем для мембранной формы. Температура сваривания всех трех форм коллагеновой матрицы была одинаковой и равнялась 54–55 градусам, что соответствует легкой степени химической сшивки коллагена.

Таблица 9 — Параметры персонализированного коллагена (мембрана, губка, интерфейс)

<b>Матрица персонализированного коллагена</b>	<b>Толщина в сухом виде, мкм</b>	<b>Набухаемость, %</b>	<b>Температура сваривания, °С</b>
<b>Мембрана</b>	0,5±0,06	304±61	55±0,8
<b>Губка</b>	1,1±0,1	711±89	54±0,6
<b>Интерфейс</b>	1,1±0,08	699±77	54±0,6

При изучении персонализированного коллагена с помощью сканирующей электронной микроскопии видна очевидная разница в структуре всех трех форм персонализированного коллагена (Рисунок 11). Стороны мембраны — плоские, бездефектные; на ее поперечном срезе видна слегка рыхлая структура (непористая), обусловленная лиофилизацией. Такая форма коллагеновой матрицы обладает самой высокой структурной целостностью и способна выдерживать большие нагрузки. Для губки характерна пористость с двух сторон, при этом на срезе видны полости пор, и такая микроструктурная характеристика матрицы необходима для наиболее быстрого врастания в нее клеток. Интерфейс с одной стороны обладает непористой структурой, а с другой — открытыми порами, при этом на срезе интерфейс пористый. Такая структура матрицы идеально подходит для регенерации эпителиальных структур, поскольку по непористой поверхности происходит наиболее быстрая эпителизация, а с другой стороны — в пористую поверхность наиболее быстро врастают клетки и сосуды, что способствует в итоге лучшему качеству эпителизации и биоинтеграции матрицы.

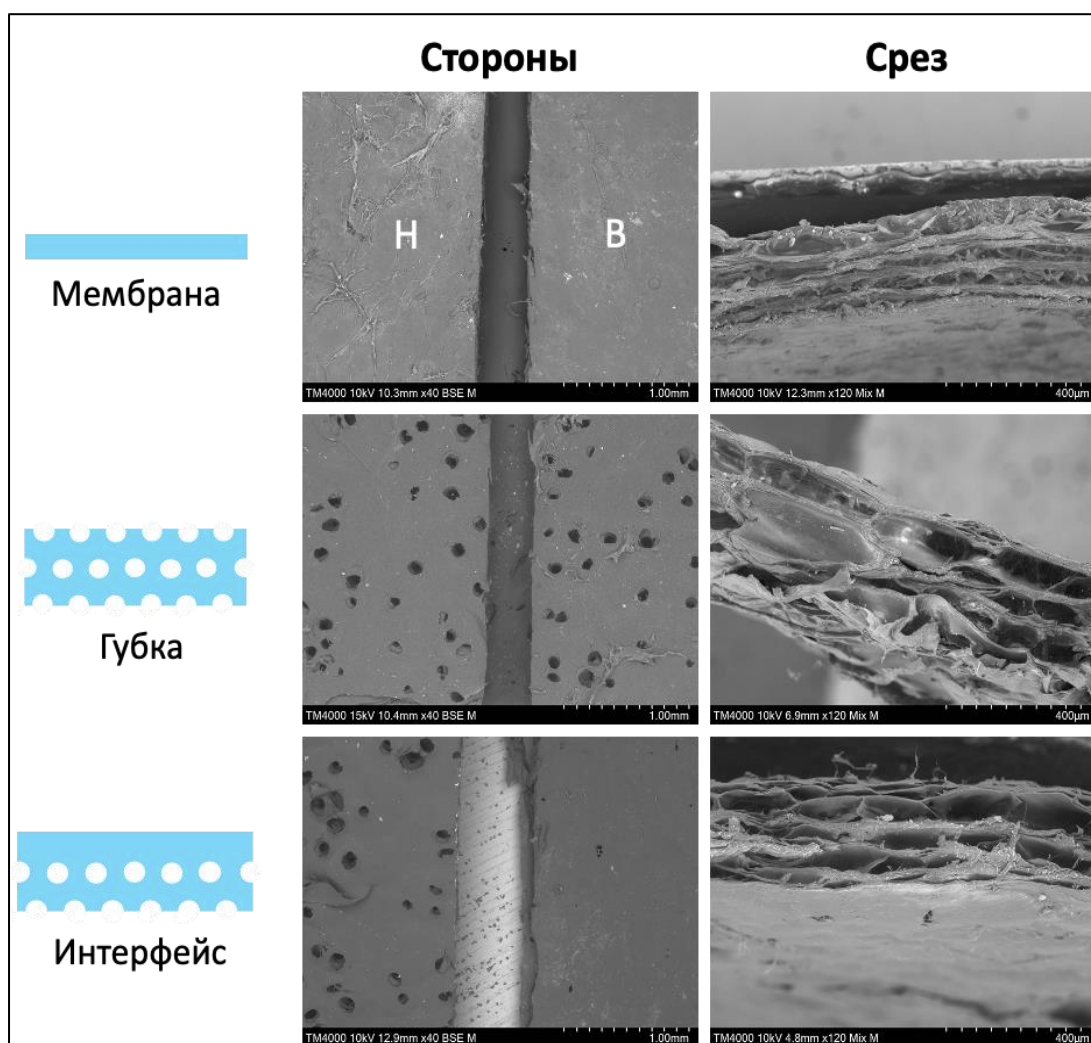


Рисунок 11 — СЭМ персонализированного коллагена — мембрана, губка, интерфейс

Мембрана имеет неперфорированные стороны, а ее срез — плотный и без наличия пор. Поверхности губки с обеих стороны перфорированные, а срез — пористый. Интерфейс перфорирован только с одной стороны, а на срезе отчетливо видно, что одна из сторон оканчивается открытыми порами (верхняя), а другая — плотная и непористая. Н — низ, В — верх.

### Результаты изучения физических свойств разработанных мембран

Ожидается, что мембранная форма матрицы обладала самой высокой степенью упругости ( $5,8 \pm 1,3$  МПа) [1], в то время как губка и интерфейс обладали в два раза меньшей упругостью  $2,2 \pm 0,5$  МПа и  $2,6 \pm 0,5$  МПа (Рисунок 12).

Растяжение на разрыв было в той же тенденции, самое высокое у мембраны —  $80,8 \pm 11$  %, в то время как у губки и интерфейса оно было схожим —  $46,2 \pm 12$  % и  $51 \pm 12$  %, соответственно.

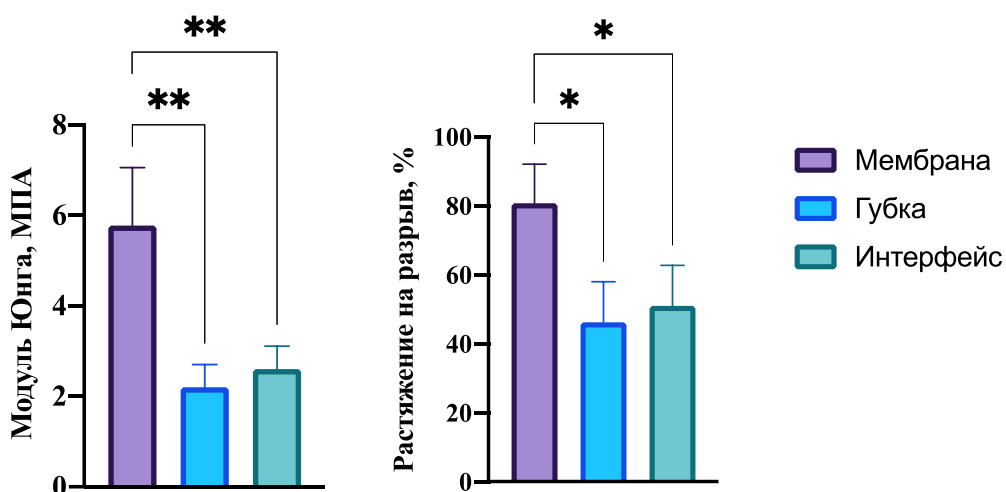


Рисунок 12 — Механические свойства персонализированных форм коллагеновой матрицы: упрочненная мембрана (мембрана); губчатая мембрана (губка); сочетание мембраны и губки (интерфейс)

### Результаты изучения биологических свойств полученных мембран *in vitro*

Согласно экстракционному тесту с Аламаровым и Пикогрином, сшивка химическим агентом не повлияла на токсические свойства персонализированного коллагена (в т. ч. в форме губки) (Рисунок 13 А). Как видно, метаболическая активность (жизнеспособность) клеток для нулевой концентрации и трехкратной концентрации была одинаковой для персонализированного коллагена; аналогично количество клеток (их ДНК), согласно тесту с Пикогрином, было одинаково для нулевой и трехкратной концентрации экстракта из персонализированных матриц. Таким образом, даже максимальные количества экстрактов из коллагеновых матриц не снизили ни пролиферативную, ни метаболическую активность клеток, как это наблюдалось в случае положительного контроля SDS [1].

Жизнеспособные клетки определяли с помощью окраски Live/Dead: живые окрашивались в зеленый, мертвые — в красный цвет. На матрицах проверялась

жизнеспособность двух типов клеток, ЗТЗ и МСК (Рисунок 13 Б). Через 6 суток культивирования клеток на всех материалах наблюдали большое количество жизнеспособных (зеленых) клеток без красных включений. Электроосажденные коллагеновые матрицы, в том числе после постобработки, позволили клеткам прикрепиться и хорошо расти в связи с отсутствием токсичности.

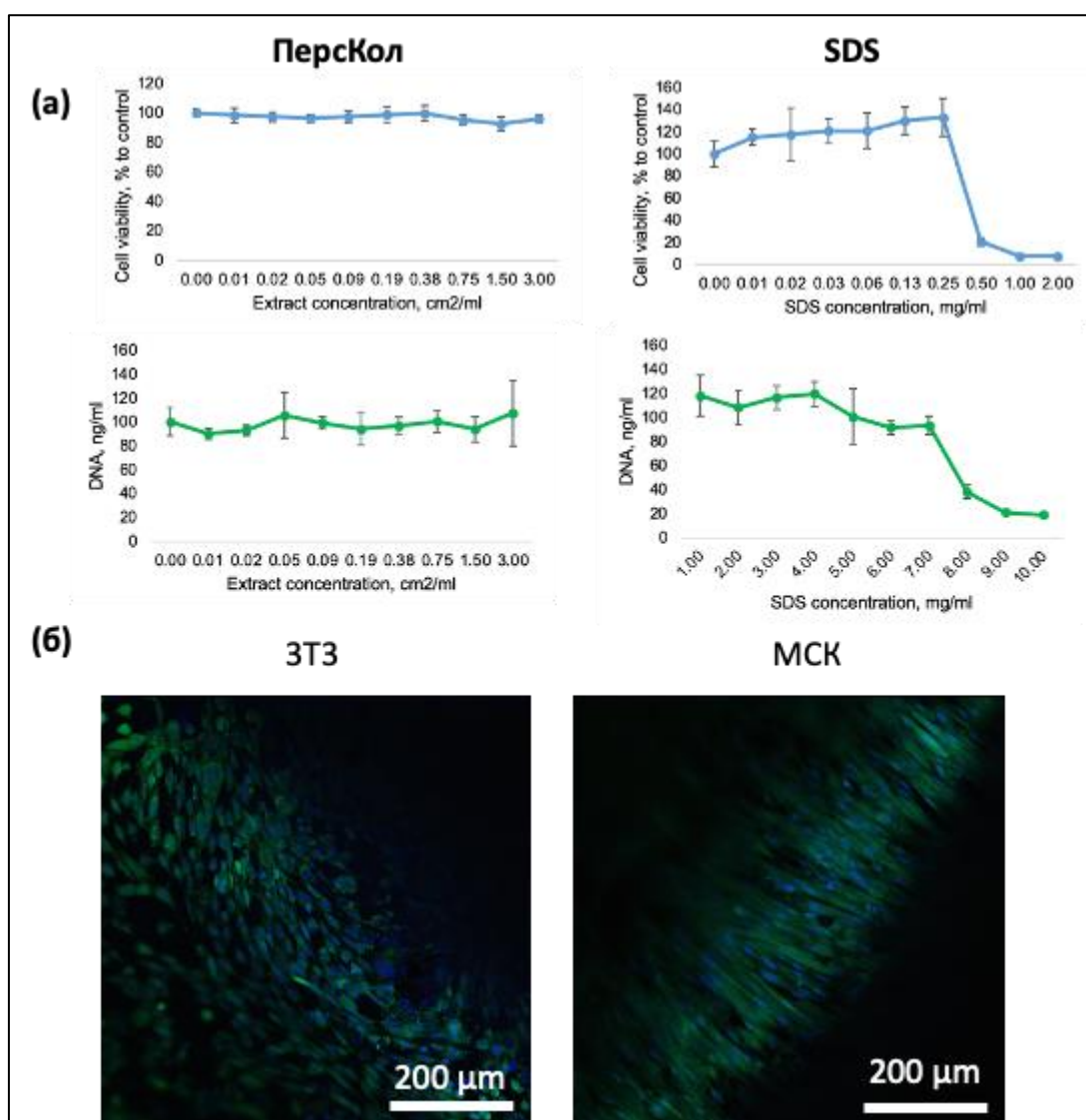


Рисунок 13 — Показатели цитотоксичности созданных персонализированных коллагеновых матриц (на примере формы «мембрана»). А) Экстракционный тест коллагеновых мембран в сравнении с контролем SDS. Б) Live/Dead тест коллагеновых мембран с двумя типами клеток, ЗТЗ и МСК

Таким образом, технические (механические) испытания позволяют сделать вывод о хороших манипуляционных свойствах персонализированной коллагеновой матрицы типа «Интерфейс» (именуемой в диссертации

«мембраной»). Матрица обладала средней степенью сшивки и пористой структурой, с одной стороны, что будет способствовать оптимальному врастанию в нее ткани и ускорит биодеградацию; с другой стороны, матрица «Интерфейс» — плоская и бездефектная, этой стороной она должна помещаться к полости рта и служить барьером для попадания в/под матрицу инородных предметов (пищи). Полученные матрицы были далее испытаны на токсичность *in vitro*, и результаты экспериментов не выявили негативного токсического влияния матриц на клетки. Все это позволяет перейти к последующему испытанию полученных персонализированных коллагеновых матриц «Интерфейс» на животных.

## **3.2. Результаты экспериментального исследования на лабораторных животных**

### **3.2.1. Результаты контрольных осмотров в послеоперационном периоде**

В послеоперационном периоде на 3-е сутки в полости рта экспериментальных животных отмечали умеренный отек в области проведения вестибулопластики как при использовании мембран, так и на стороне без их применения. В области твердого неба отек был незначительным в зоне имплантации мембран, чаще при применении мембран с лактоферрином (100 %), в зоне контрольных раневых дефектов отек был умеренным.

На 5-е сутки в полости рта у экспериментальных животных сохранялся незначительный отек в зоне проведения вестибулопластики и на твердом небе в группе применения мембран с лактоферрином и без него. Гиперемия не определялась или была незначительной в группе животных с применением мембран с лактоферрином, в группе использования мембран без него гиперемия была умеренной и даже выраженной. Наиболее выраженные отек и гиперемия наблюдали на контрольной стороне оперативного вмешательства, где заживление проходило естественным образом.

На 7-е сутки отек и гиперемия не определялись на стороне применения мембран с лактоферрином как в области твердого неба, так и в области проведения вестибулопластики у 10 (83 %) животных, у 17 % (2 кролика) отек оставался незначительным. На стороне применения мембран без лактоферрина отек не выявляли, однако сохранялась незначительная гиперемия, в то время как на контрольной стороне без применения мембран гиперемия была умеренной. В области заживления раневых дефектов естественным путем гиперемия оставалась незначительной у 10 (83 %) животных, у 2 кроликов (17 %) была умеренной; отек у 67 % животных (4 кролика) оставался незначительным как в области проведения вестибулопластики, так и в области твердого неба.

Результаты осмотра животных на различных сроках эксперимента представлены в Таблицах 10–13.

Таблица 10 — Динамика изменения гиперемии слизистой оболочки преддверия полости рта лабораторных животных в эксперименте

Метод	3-и сутки Me±m Median Min- Max	5-е сутки Me±m Median Min-Max	7-е сутки Me±m Median Min-Max	P
Коллагеновая мембрана	2,3±0,5 2 2–3	1,8±0,8 2 1–3	1,3±0,5 1 1–2	>0,05
Коллагеновая мембрана+лактоферрин	2,2±0,5 2 2–3	0,8±0,4 1 0–1	0,5±0,5 0,5 0–1	< <b>0,001</b>
Mucograft	1,7±0,4 2 1–2	1,8±0,4 2 1–2	1,3±0,5 1 1–2	< <b>0,001</b>
Заживление вторичным натяжением	2±0,9 2 1–3	1,5±0,8 1 1–3	0,8±0,75 1 0–2	>0,05
P	>.05	>.05	>.05	

Таблица 11 — Динамика изменения отека слизистой оболочки преддверия полости рта лабораторных животных в эксперименте

Метод	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки	P
Коллагеновая мембрана	2±0 2 2–2	1,7±0,5 2 1–2	0,7±0,5 1 0–1	< <b>0,001</b>
Коллагеновая мембрана+лактоферрин	1,5±0,5 1,5 1–2	1,3±0,5 1 1–2	0,3±0,5 0 0–1	< <b>.05</b>
Mucograft	2,2±0,4 2 2–3	1,5±0,5 1,5 1–2	1,3±0,5 1 1–2	< <b>0,001</b>
Заживление вторичным натяжением	2±0 2 2–2	1,5±0,5 1,5 1–2	0,8±0,4 1 0–1	< <b>0,001</b>
P	>.05	>.05	< <b>0,001</b>	

Таблица 12 — Динамика изменения гиперемии слизистой оболочки твердого неба у лабораторных животных в эксперименте

Метод	3-и сутки Me±m Median Min– Max	5-е сутки Me±m Median Min–Max	7-е сутки Me±m Median Min–Max	p
Коллагеновая мембрана	1,5±0,5 1,5 1–2	0,7±0,5 1 0–1	0,5±0,6 0,5 0–1	< <b>0,001</b>
Коллагеновая мембрана+лактоферрин	0,8±0,8 1 0–2	0,5±0,5 0,5 0–1	0,2±0,4 0 0–1	>.05
Mucograft	1,3±0,5 1 1–1,8	1,8±0 2 1–2	0,5±0,5 0,5 0–1	>.05
Заживление вторичным натяжением	2±0,6 2 1–3	1±0,6 1 0–2	0,7±0,6 1 0–1	< <b>0,001</b>
P	>.05	>.05	>.05	

Таблица 13 — Динамика изменения отека слизистой оболочки твердого неба у лабораторных животных в эксперименте

Метод	3-и сутки Me±m Median Min– Max	5-е сутки Me±m Median Min–Max	7-е сутки Me±m Median Min–Max	P
Коллагеновая мембрана	1,5±0,5 1,5 1–2	0,7±0,5 1 0–1	0 0 0	< 0,001
Коллагеновая мембрана+лактоферрин	1±0 1 1–1	0,5±0,5 0,5 0–1	0 0 0	< 0,001
Mucograft	1,3±0,5 1 1–2	0,7±0,5 1 0–1	0 0 0	< 0,001
Заживление вторичным натяжением	2±0 2 2–2	1,3±0,5 1 1–2	0,2±0,4 0 0–1	< 0,001
P	< 0,001	>.05	>.05	

На 7-е сутки в зоне твердого неба отмечали начало процесса эпителизации, что было особенно выражено в группе применения мембран для закрытия раневого дефекта. Эпителизация более интенсивно протекала в зоне проведения операции на твердом небе по сравнению с областью вестибулопластики, однако без существенных различий между контрольной стороной и стороной применения коллагеновых мембран ( $p>0,05$ ).

На 14 сутки практически 100 % заживление в области твердого неба в группе применения ПерсКоллагена и ПерсКоллагена с лактоферрина по сравнению с контрольной стороной (вторичное заживление или при использовании Mucograft). Полную или практически полную эпителизацию в зоне проведения вестибулопластики отмечали на стороне использования мембраны с лактоферрином. В области применения мембраны без лактоферрина и на стороне заживления вторичным натяжением результаты были сопоставимы, а полнота эпителизации колебалась от 70 до 90 % площади раны.

Результаты эпителизации операционных дефектов в зависимости от методов их устранения представлены в Таблицах 14–15.

Таблица 14 — Степень эпителизации интраоперационного дефекта (в % от начальной площади) в области преддверия полости рта лабораторных животных (7,14 сутки)

Метод	7-е сутки Me±m Median Min–Max	14-е сутки Me±m Median Min–Max	P
Коллагеновая мембрана	45±13,8 40 30–70	80,8±10,7 80 70–95	>.05
Коллагеновая мембрана+лактоферрин	55,8±19,1 47,5 40–80	95±3,2 95 90–100	<b>&lt; 0,001</b>
Mucograft	50±11,4 47,5 40–70	80±7,1 80 70–90	<b>&lt; 0,001</b>
Заживление вторичным натяжением	48,3±7,5 50 35–55	90±5,5 90 85–100	<b>&lt; 0,001</b>
P	> .05	<b>&lt; 0,001</b>	

Таблица 15 — Полнота эпителизации операционного дефекта (в % от площади раны) у лабораторных животных на твердом небе в послеоперационном периоде (7 и 14 сутки)

Метод	7-е сутки Me±m Median Min–Max	14-е сутки Me±m Median Min–Max	P
Коллагеновая мембрана	60±10 60 45–70	90,8±5,8 92,5 80–95	<b>&lt; 0,001</b>

Продолжение Таблицы 15

Коллагеновая мембрана+лактоферрин	84,2±2 85 80–85	99,2±2 100 95–100	<b>&lt; 0,001</b>
Mucograft	74,2±7,4 72,5 65–85	95±4,5 95 90–100	<b>&lt; 0,001</b>
Заживление вторичным натяжением	56,7±20 65 25–75	88,3±13,7 92,5 65–100	<b>&lt; 0,001</b>
<b>P</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	

### 3.2.2. Результаты морфологического исследования

Биоптаты твердого неба были покрыты значительно утолщенным многослойным плоским неороговевающим эпителием. На некоторых участках эпителий с акантозом и пролиферацией базального слоя образовывал выпячивания в толщу дермы. Участков некроза эпителия не обнаруживали. Дерма вне зоны имплантации была без особенностей, с легкими признаками хронического воспаления вблизи сосудов. В области хирургического вмешательства в дерме определяли небольшие участки некроза вокруг шовного материала, окруженные иммунными клетками, в 2-х образцах из 6-ти. Области имплантации в средней своей части были представлены элементами коллагенового материала, состоящими из однонаправленных коллагеновых волокон, значительно утолщенных за счет гиалиноза (Рисунки 14 В, 15 В). Между волокнами проникали тонкие прослойки грануляционной ткани, иммунные клетки (сегментоядерные нейтрофилы, макрофаги, плазмоциты) и фибробласты в небольшом количестве. На периферии имплантата обнаруживали большее количество грануляционной ткани с

новообразованными сосудами с тонкими стенками и выстланными сформированными эндотелиоцитами. Некоторые сосуды имели толстую стенку с гладкими миоцитами в *tunica media*. Плотность сосудов составляла в среднем 490 на 1 мм<sup>2</sup> препарата. Также наблюдали формирование тонких пучков соединительнотканых волокон, располагавшихся параллельно друг другу, с единичными «сосудистыми петлями». Признаки экссудации и микроциркуляторных нарушений были слабыми. Подлежащие ткани были представлены жировой клетчаткой с тонкими фиброзными прослойками, содержащей крупные расширенные полнокровные сосуды различных типов с незначительной лимфоидной периваскулярной инфильтрацией, а также утолщенные нервные стволы. На периферии гистологических препаратов были скелетные мышцы и слизисто-белковые железы без особенностей.

При окрашивании по Маллори в дерме в зоне операции область имплантации была представлена элементами коллагенового материала, состоящими из однонаправленных коллагеновых волокон, значительно утолщенных за счет гиалиноза и окрашенные в ярко-синий цвет (Рисунок 16 В). На некоторых участках формирующиеся тонкие волокна коллагена имели светло-голубую окраску. Ядра фибробластов были красноватого цвета, ядра иммунных клеток — красновато-фиолетового цвета. Фибрина и эластических волокон не обнаруживали. При иммуногистохимической реакции с антителами к  $\alpha$ -SMA определяли умеренную экспрессию в миофибробластах, а также в гладких миоцитах в сосудистой стенке (++) (Рисунок 17 В).

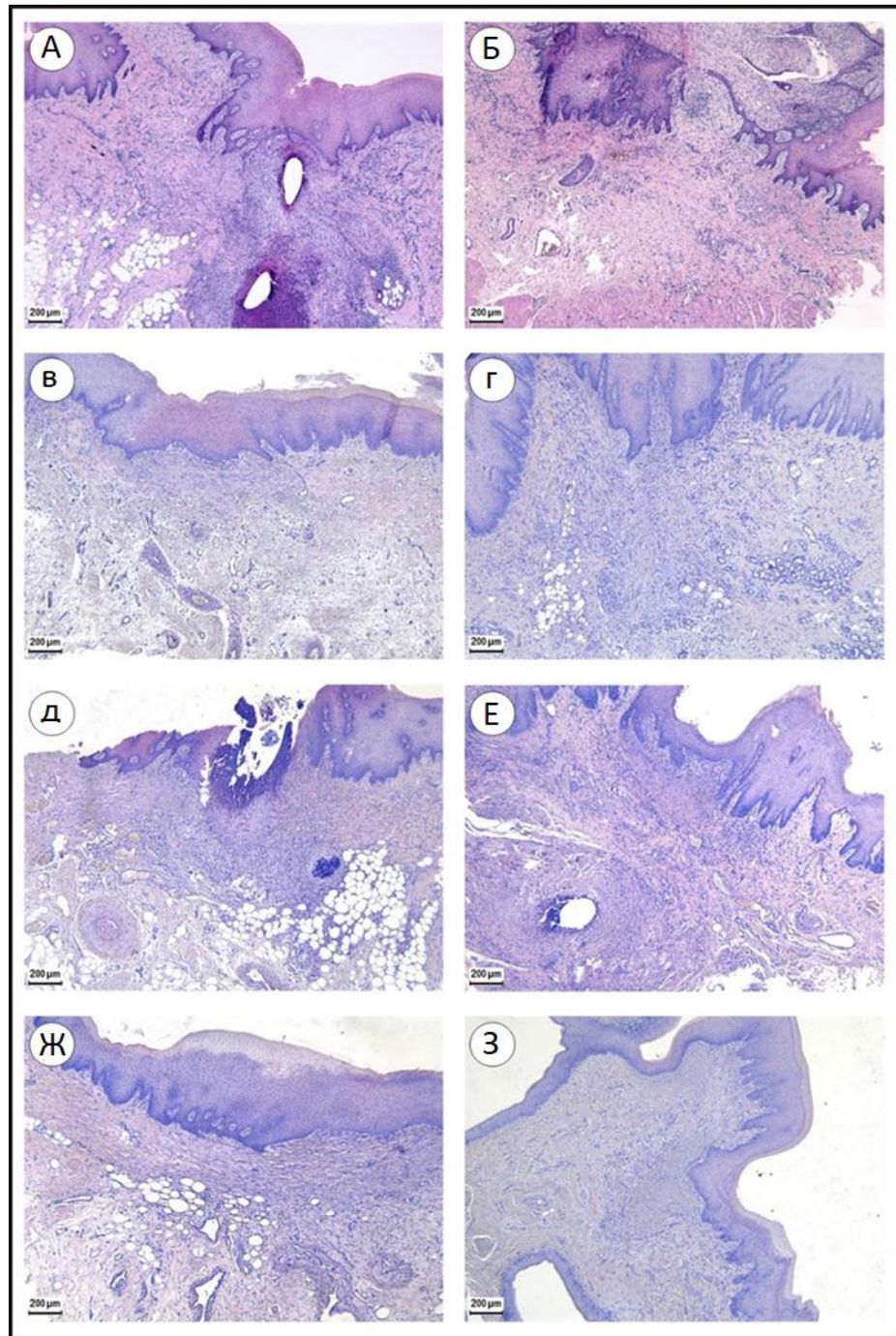


Рисунок 14 — Микроструктура без имплантированного материала и после имплантации в область интраоперационного дефекта слизистой твердого неба и области преддверия полости рта лабораторных животных матрикса Mucograft, разработанной коллагеновой мембраны и разработанной коллагеновой мембраны с лактоферрином: заживление вторичным натяжением — твердое небо (А) и преддверие полости рта (Б); при использовании матрикса Mucograft — твердое небо (В) и преддверие полости рта (Г); при применении разработанной коллагеновой мембраны — твердое небо (Д) и преддверие полости рта (Е); при применении разработанной коллагеновой мембраны с лактоферрином — твердое небо (Ж) и преддверие полости рта (З). Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 50$

## Коллаген без лактоферрина

При исследовании образцов реконструированного обычной коллагеновой мембраной неба определяли участки дефектов, которые были выстланы многослойным плоским неороговевающим эпителием, а также протяженные зоны некроза эпителия с проникновением некротического детрита и сопутствующего воспаления в дерму. Вблизи зон некроза определяли признаки экссудации и микроциркуляторных нарушений. На отдельных участках эпителий с умеренным акантозом и пролиферацией базального слоя (Рисунки 14 Д, 2 Д). Вне зоны операции дерма была без особенностей, с незначительными признаками хронического воспаления. В дерме и подлежащих тканях в месте имплантации коллагеновой мембраны определяли грануляционную ткань в большом количестве, а также новообразованную соединительную ткань, построенную из разнонаправленных пучков тонких коллагеновых волокон. Некоторые волокна были утолщены, с признаками гиалиноза и фиброза. Между коллагеновых волокон выявляли фибробласты и иммунные клетки (сегментоядерные нейтрофилы, макрофаги, плазмоциты). Также в данной области присутствовало умеренное количество новообразованных сосудов с тонкими не полностью сформированными стенками и выстилкой из истонченного эндотелия. Часть сосудов была представлена полостью, выстланной едва намечавшимися эндотелиальными клетками и заполненной эритроцитами. Плотность васкуляризации в среднем составляла 380 сосудов на 1 мм<sup>2</sup>. Местами сосуды были окружены умеренно выраженной инфильтрацией, представленной лимфоцитами, макрофагами и единичными эозинофилами. На некоторых участках просветы сосудов были спавшимися. На периферии гистологических срезов присутствовали небольшие участки жировой клетчатки, содержавшие нервные стволы, толстостенные полнокровные сосуды венозного и артериального типов, мелкие капилляры и слизисто-белковые железы.

При окраске по Маллори в дерме в области имплантации коллагеновой мембраны выявляли разнонаправленные пучки тонких коллагеновых волокон,

окрашенные в светло-голубой цвет. Ядра фибробластов были красноватого цвета. Фибрина и эластических волокон не обнаружено (Рисунок 16 Д). При иммуногистохимической реакции с антителами к SMA определяли умеренную экспрессию в фибробластах (++), а также в мышечной оболочке сосудов (++) (Рисунок 17 Д). Миофибробласты образовывали толстый слой  $\alpha$ -SMA положительных клеток под эпителием в участке имплантации.

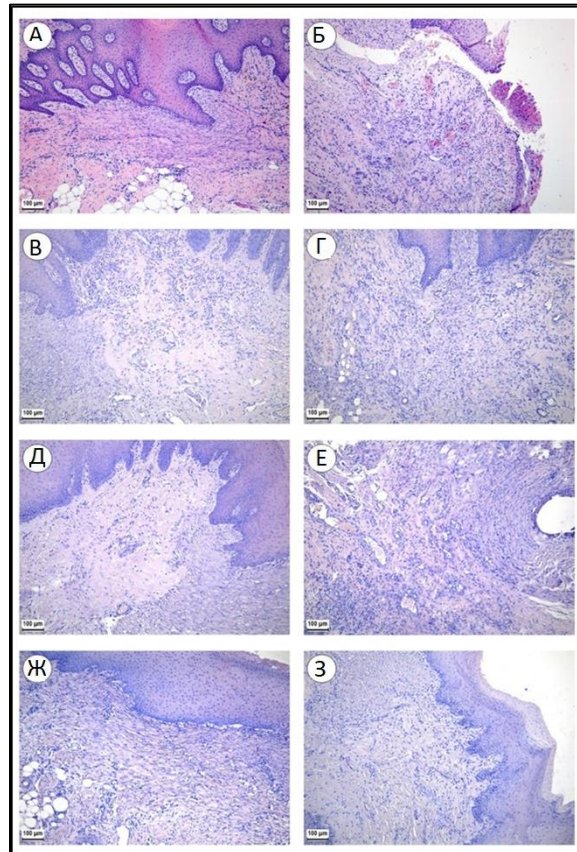


Рисунок 15 — Микроструктура без имплантированного материала и после имплантации в область интраоперационного дефекта слизистой твердого неба и области преддверия полости рта лабораторных животных матрикса Mucograft, разработанной коллагеновой мембраны и разработанной коллагеновой мембраны с лактоферрином: заживление вторичным натяжением — твердое небо (А) и преддверие полости рта (Б); при использовании матрикса Mucograft — твердое небо (В) и преддверие полости рта (Г); при применении разработанной коллагеновой мембраны — твердое небо (Д) и преддверие полости рта (Е); при применении разработанной коллагеновой мембраны с лактоферрином — твердое небо (Ж) и преддверие полости рта (З). Окраска гематоксилин-эозином, увеличение x100

## Коллаген с лактоферрином

При исследовании образцов твердого неба, реконструированного коллагеновой мембраной с лактоферрином, определяли участки дефектов, которые были высланы многослойным плоским неороговевающим эпителием без признаков дистрофии. В отдельных участках обнаружили эпителий с пролиферацией базального слоя. Некротических изменений в эпителии не было (Рисунки 14 Ж, 2 Ж). В дерме и подлежащих тканях в месте имплантации коллагеновой мембраны определяли грануляционную ткань в небольшом количестве, а также новообразованную соединительную ткань, построенную из однонаправленных незначительно утолщенных коллагеновых волокон, образующих параллельные пучки с «сосудистыми петлями». Также в данной области присутствовали фибробласты с вытянутыми овоидными базофильными ядрами, а также иммунные клетки в небольшом количестве. Стоит отметить обильную васкуляризацию в зоне имплантации: определяли большое количество новообразованных сосудов с многослойной сформированной толстой стенкой и выстилкой из эндотелия обычного строения. Плотность васкуляризации в среднем составляла 560 сосудов на 1 мм<sup>2</sup>. Местами сосуды были окружены слабой инфильтрацией из лимфоцитов, макрофагов и единичных эозинофилов. На периферии гистологических срезов присутствовали небольшие участки жировой клетчатки, содержавшие нервные стволы, толстостенные полнокровные сосуды венозного и артериального типов, мелкие капилляры и слизисто-белковые железы.

При окраске по Маллори в дерме в области имплантации коллагеновой мембраны определяли однонаправленные пучки коллагеновых волокон темно-синего цвета. Ядра фибробластов красноватого цвета (Рисунок 16 Ж). Пучки мышечных волокон были окрашены в желтоватый цвет. Фибрина и эластических волокон не выявляли. При иммуногистохимической реакции с антителами к SMA определяли слабую экспрессию в фибробластах (+) и умеренную в мышечной оболочке сосудов (++) (Рисунок 17 Ж).

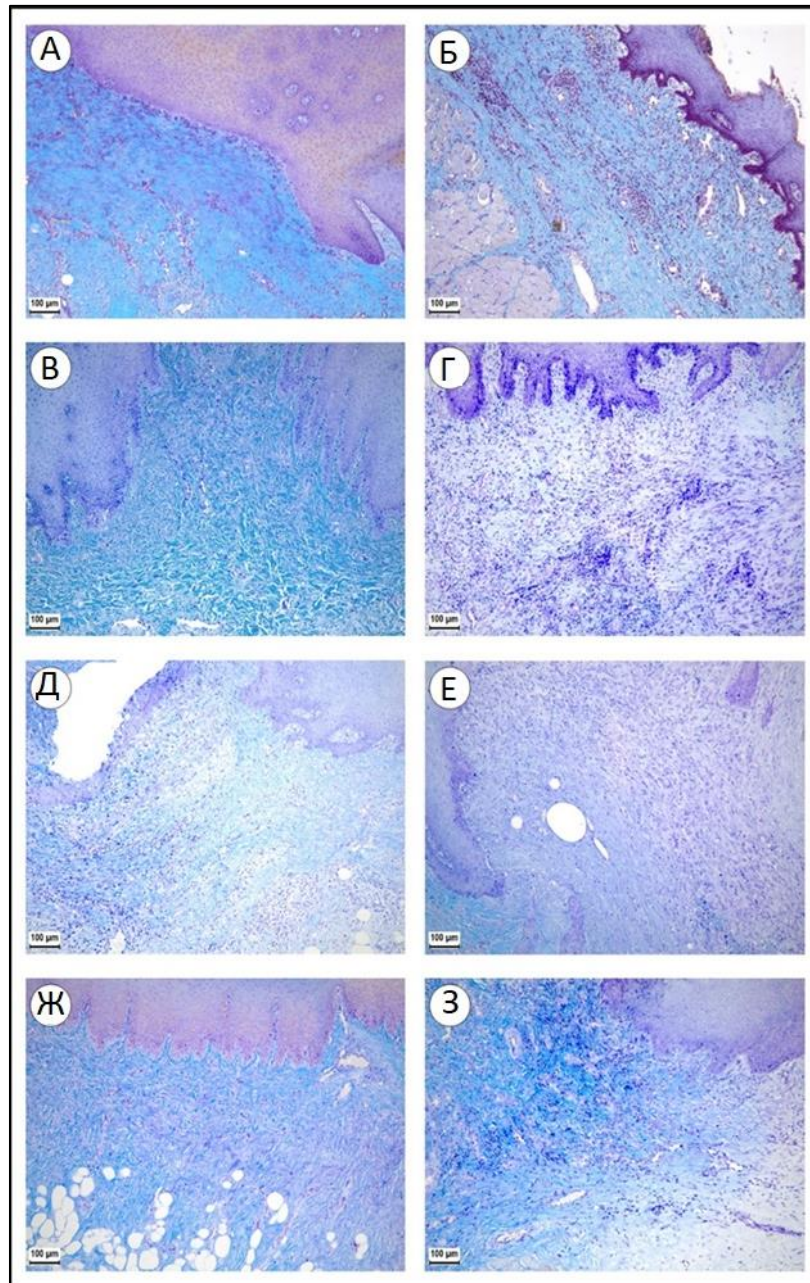


Рисунок 16 — Микроструктура без имплантированного материала и после имплантации в область интраоперационного дефекта слизистой твердого неба и области преддверия полости рта лабораторных животных матрикса Mucograft, разработанной коллагеновой мембраны и разработанной коллагеновой мембраны с лактоферрином: заживление вторичным натяжением — твердое небо (А) и преддверие полости рта (Б); при использовании матрикса Mucograft — твердое небо (В) и преддверие полости рта (Г); при применении разработанной коллагеновой мембраны — твердое небо (Д) и преддверие полости рта (Е); при применении разработанной коллагеновой мембраны с лактоферрином — твердое небо (Ж) и преддверие полости рта (З). Окраска по Маллори, увеличение  $\times 100$

## Вестибулярная часть верхней челюсти

### Группа без применения мембран

В контрольных образцах вестибулярной части челюсти дефекты были выстланы многослойным плоским неороговевающим эпителием. На отдельных участках эпителий был тонким или утолщенным по сравнению с нормой, а также образовывал отростки, проникающие в дерму (Рисунки 14 Б, 2 Б). На некоторых участках эпителий был некротизирован. Отмечали выраженный акантоз и пролиферация базальных слоев. В дерме в зоне операции выявили очаги некроза, инфильтрированные нейтрофилами, а также окруженные валами из сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов и плазмоцитов. Вблизи зон некроза обнаружили признаки экссудации и микроциркуляторных нарушений, а также зоны роста грануляционной ткани, причем в некоторых областях соединительная ткань была сформирована. Коллагеновые волокна на большинстве участков имели одинаковое направление, с небольшим количеством фибробластов. Выявляли тонкостенные сосуды, с плотностью 410 сосудов на 1 мм<sup>2</sup>. Вокруг сосудов отмечали умеренную инфильтрацию из нейтрофилов и лимфоцитов. Некоторые сосуды были прошиты синтетическим шовным материалом. Подлежащие ткани были представлены пучками скелетных мышечных волокон, жировой клетчаткой с тонкими фиброзными прослойками и крупными полнокровными сосудами различных типов. Воспалительной инфильтрации не было обнаружено. Также присутствовали мелкие слизисто-белковые железы обычного строения.

При окрашивании по Маллори в дерме в зоне операции выявляли однонаправленные, параллельные пучки коллагеновых волокон голубоватого цвета (Рисунок 16 Б). Ядра фибробластов, а также воспалительных клеток были темно-красного цвета. Мышечные волокна были желтоватые. Фибрина и эластических волокон не обнаружили. При иммуногистохимической реакции с антителами к SMA определяли слабую экспрессию в мышечной оболочке сосудов (+) (Рисунок 17 Б).

## Mucograft

При исследовании фрагментов вестибулярной части челюсти с имплантированным коммерческим коллагеновым материалом (Mucograft) выявляли следующие изменения при световой микроскопии. Фрагменты были покрыты значительно утолщенным многослойным плоским неороговевающим эпителием. На некоторых участках эпителий с акантозом и пролиферацией базального слоя образовал выпячивания, вдававшиеся в толщу дермы. Участков некроза эпителия не обнаружено. Дерма вне зоны имплантации была без особенностей, с легкими признаками хронического воспаления вблизи сосудов (Рисунки 14 Г, 2 Г). В 2-х образцах из 3-х в области хирургического вмешательства в дерме определяли небольшие участки некроза вокруг шовного материала, окруженные иммунными клетками. Средняя часть областей имплантации была представлена элементами коллагенового материала, состоящими из однонаправленных коллагеновых волокон, значительно утолщенных за счет гиалиноза. Между волокнами проникали тонкие прослойки грануляционной ткани, иммунные клетки (сегментоядерные нейтрофилы, макрофаги, плазмоциты) и фибробласты в небольшом количестве. На периферии имплантата присутствует большее количество грануляционной ткани с новообразованными сосудами с тонкими стенками и выстланными сформированными эндотелиоцитами. Некоторые сосуды имели толстую стенку с гладкими миоцитами в tunica media. Плотность сосудов составляла в среднем 410 на 1 мм<sup>2</sup> препарата. Также наблюдали формирование тонких пучков соединительнотканых волокон, располагающихся параллельно друг другу, с единичными «сосудистыми петлями». Признаки экссудации и микроциркуляторных нарушений были слабыми. Подлежащие ткани были представлены пучками скелетных мышечных волокон, жировой клетчаткой с тонкими фиброзными прослойками и крупными полнокровными сосудами различных типов. Воспалительная инфильтрация была слабая. Также присутствовали мелкие слизисто-белковые железы обычного строения.

При окрашивании по Маллори в дерме в зоне операции область имплантации была представлена элементами коллагенового материала, состоящими из однонаправленных коллагеновых волокон, значительно утолщенных за счет гиалиноза и окрашенных в ярко-синий цвет (Рисунок 16 Г). На некоторых участках формирующиеся тонкие волокна коллагена имели светло-голубую окраску [1]. Ядра фибробластов были красноватого цвета, ядра иммунных клеток — красновато-фиолетового цвета. Фибрина и эластических волокон не обнаружили. При иммуногистохимической реакции с антителами к  $\alpha$ -SMA определяли умеренную экспрессию в мио- и фибробластах, а также в гладких миоцитах в сосудистой стенке (++) (Рисунок 17 Г).

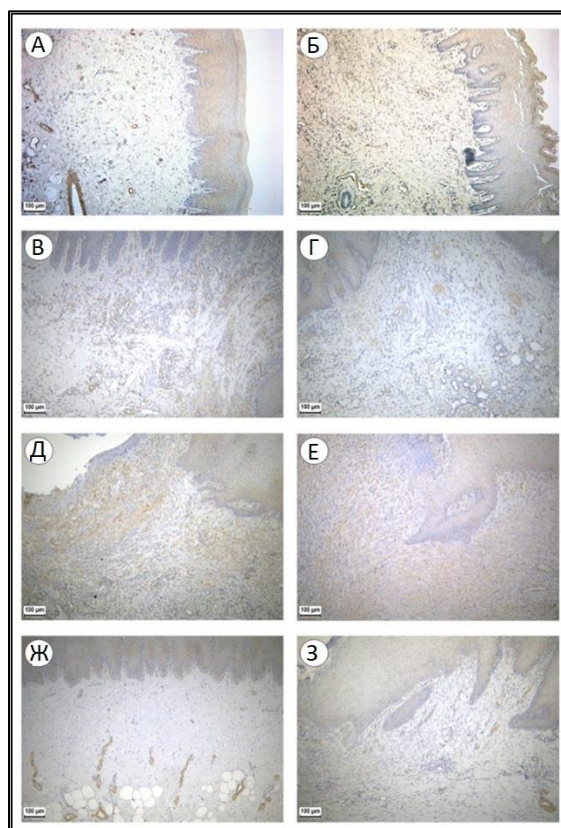


Рисунок 17 — Альфа-гладкомышечный актин в участках имплантации матрикса и мембран и без имплантации материалов: заживление вторичным натяжением — твердое небо (А) и преддверие полости рта (Б); при использовании матрикса Mucograft — твердое небо (В) и преддверие полости рта (Г); при применении разработанной коллагеновой мембраны — твердое небо (Д) и преддверие полости рта (Е); при применении разработанной коллагеновой мембраны с лактоферрином — твердое небо (Ж) и преддверие полости рта (З).

ИГХ-реакция с антителами против альфа-гладкомышечного актина, контрастирование гематоксилином, увеличение x100

## Коллаген без лактоферрина

При исследовании образцов реконструированного обычной коллагеновой мембраной вестибулярной части челюсти определяли участки дефектов, покрытые многослойным плоским неороговевающим эпителием. На некоторых участках выявляли обширные зоны некроза эпителия с проникновением некротического детрита и сопутствующего воспаления в дерму. Вблизи зон некроза определяли признаки экссудации и микроциркуляторных нарушений. На отдельных участках был эпителий с умеренным акантозом и пролиферацией базального слоя (Рисунки 14 Е, 2 Е). Вне зоны операции дерма была без особенностей, с незначительными признаками хронического воспаления. В дерме и подлежащих тканях в месте имплантации коллагеновой мембраны определяли грануляционную ткань в большом количестве, а также новообразованную соединительную ткань, построенную из разнонаправленных пучков тонких коллагеновых волокон. Некоторые волокна были утолщены, с признаками гиалиноза и фиброза. Между коллагеновых волокон располагались фибробласты и иммунные клетки в большом количестве (сегментоядерные нейтрофилы, макрофаги, плазмоциты). Также в данной области выявляли новообразованные сосуды с тонкими не полностью сформированными стенками и выстилкой из истонченного эндотелия. Часть сосудов была представлена полостью, выстланной одним слоем формирующихся эндотелиоцитов. Плотность васкуляризации в среднем составляла 370 сосудов на 1 мм<sup>2</sup>. Местами сосуды были окружены умеренно выраженной инфильтрацией, представленной лимфоцитами, макрофагами и единичными эозинофилами. На некоторых участках просветы сосудов были спавшимися. Подлежащие ткани были представлены пучками скелетных мышечных волокон, жировой клетчаткой с тонкими фиброзными прослойками и крупными полнокровными сосудами различных типов. Воспалительную инфильтрацию не обнаружили. Также присутствовали мелкие слизисто-белковые железы обычного строения.

При окраске по Маллори в дерме в области имплантации коллагеновой мембраны обнаружили разнонаправленные пучки тонких коллагеновых волокон,

окрашенные в светло-голубой цвет. Ядра фибробластов были красноватого цвета. Фибрин и эластические волокна отсутствовали (Рисунок 16 E). При иммуногистохимической реакции с антителами к SMA определяли умеренную экспрессию в фибробластах (++), а также в мышечной оболочке сосудов (++) (Рисунок 17 E). Миофибробласты образовывали толстый слой  $\alpha$ -SMA положительных клеток под эпителием в участке имплантации.

### **Коллаген с лактоферрином**

Реконструированный коллагеновой мембраной с лактоферрином дефект вестибулярной части челюсти был покрыт непрерывным многослойным плоским неороговевающим эпителием. Местами в эпителии определяли пролиферацию базального слоя. Некротические изменения не выявляли (Рисунок 14 З, 2 З). В дерме и подлежащих тканях в месте имплантации коллагеновой мембраны определяли новообразованную соединительную ткань, построенную из однонаправленных незначительно утолщенных коллагеновых волокон, образовавших параллельные пучки с «сосудистыми петлями». Также в данной области присутствовали фибробласты с вытянутыми овоидными базофильными ядрами, а также небольшое количество иммунных клеток. Отмечали наличие грануляционной ткани в небольшом количестве. Выявляли большое число новообразованных сосудов с полностью сформированной толстой стенкой из нескольких слоев и выстилкой из эндотелия обычного строения. Плотность васкуляризации в среднем составляла 540 сосудов на 1 мм<sup>2</sup>. Местами сосуды были окружены слабой инфильтрацией из лимфоцитов, макрофагов и единичных эозинофилов. На периферии фрагментов присутствовали небольшие участки жировой клетчатки, содержащие нервные стволы, толстостенные полнокровные сосуды венозного и артериального типов, мелкие капилляры и волокна скелетных мышц обычного строения.

При окраске по Маллори в дерме в области имплантации коллагеновой мембраны определяли однонаправленные пучки коллагеновых волокон темно-

синего цвета. Ядра фибробластов красноватого цвета (Рисунок 16 З). Пучки мышечных волокон были окрашены в желтоватый цвет. Фибрина и эластических волокон не выявляли. При иммуногистохимической реакции с антителами к SMA наблюдали слабую экспрессию в фибробластах (+) и умеренную в мышечной оболочке сосудов (++) (Рисунок 17 З).

Результаты морфологической оценки элементов воспаления в биоптатах разных групп представлены на Рисунке 18.

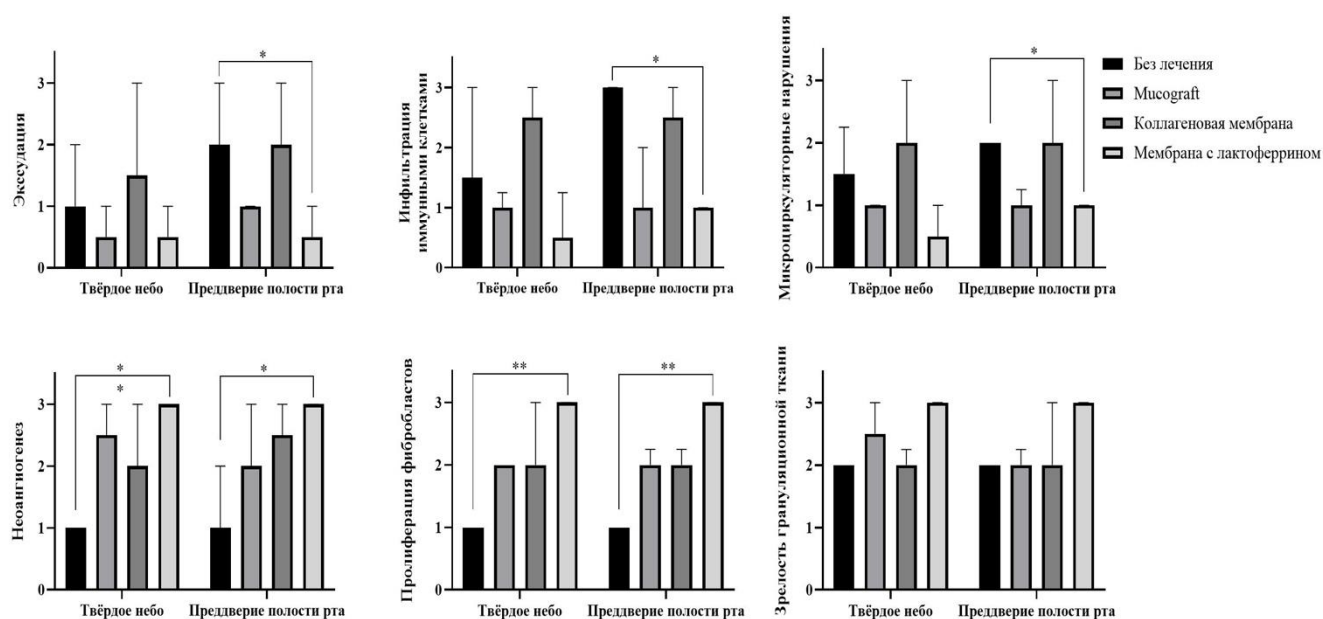


Рисунок 18 — Статистический анализ морфологических признаков воспаления и регенерации в участках имплантации. Median values ± interquartile range.

\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

При изучении образцов неба и вестибулярной части челюсти с имплантированными в них мембранами 3-х разных типов (Mucograft, коллагеновая без и с лактоферрином) наблюдали различные изменения. При использовании Mucograft репаративные процессы, формирование соединительной ткани и неоангиогенез шли умеренным темпом и были заметны преимущественно на периферии имплантата, некротических и воспалительных изменений не отмечалось. При имплантации мембраны из персонализированного коллагена присутствовали выраженные некротические и иммунные реакции, формирование

соединительной ткани и сосудов было медленным. При использовании мембраны из персонализированного коллагена с добавлением лактоферрина отмечали уменьшение выраженности некротических процессов и иммунных реакций, а также более быстрое формирование и созревание коллагеновых волокон в месте имплантации и образование сосудов.

### **3.3. Результаты микробиологического исследования**

#### **Анализ количественного изменения микроорганизмов на поверхности коллагеновых мембран**

Результаты микробного роста условно патогенных бактерий на поверхности коллагеновых мембран на различных сроках исследования представлены в Таблице 16. На Рисунке 19 представлены кривые роста использованных в исследовании штаммов.

В результате исследования ростовых свойств использованных в исследовании штаммов микроорганизмов можно констатировать незначительные отличия в продолжительности основных фаз роста и способности накопления биомассы. Схожие ростовые свойства штаммов различных родов и видов в планктонной культуре могут иметь существенные различия при формировании биопленок.

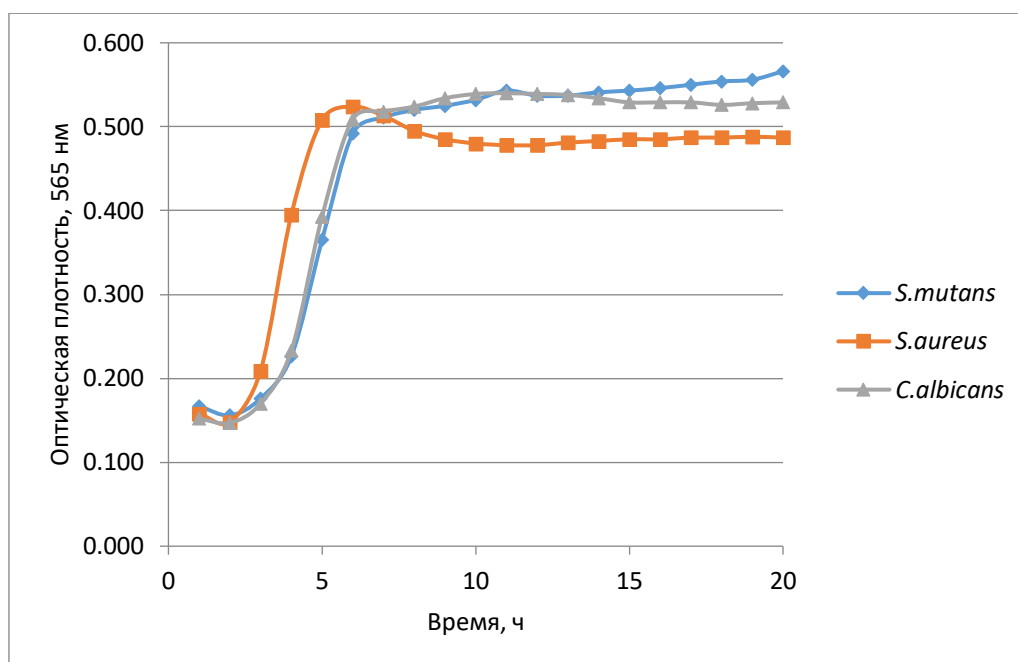


Рисунок 19 — Кривые роста и накопления биомассы использованных в исследовании штаммов микроорганизмов

Таблица 16 — Количество жизнеспособных микроорганизмов в составе образовавшихся на образцах мембран биопленок (мембрана «2» — разработанная мембрана из коллагена; мембрана «3» — разработанная мембрана из коллагена с лактоферрином)

Мембрана	Микроорганизм	3 суток	5 суток	7 суток
2	<i>Streptococcus mutans</i> №22081	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
	<i>Staphylococcus aureus</i> №884	$2,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$
	<i>Candida albicans</i> №15	$7,2 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$
	<i>P</i>	<0,05	<0,05	<0,05
3	<i>Streptococcus mutans</i> №22081	$8,0 \times 10^6$	$3,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
	<i>Staphylococcus aureus</i> №884	$3,4 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$
	<i>Candida albicans</i> №15	$5,0 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$
	<i>P</i>	<0,05	<0,05	<0,05
Mucograft	<i>Streptococcus mutans</i> №22081	$1,2 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
	<i>Staphylococcus aureus</i> №884	$2,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$
	<i>Candida albicans</i> №15	$7,0 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$
	<i>P</i>	<0,05	<0,05	<0,05

Согласно результатам исследования (Таблица 16, для *Streptococcus mutans* № 22081 количество жизнеспособных бактерий в составе образовавшихся 3-суточных биопленок на разных мембранах находилось в диапазоне  $8,0 \times 10^6$  –  $2,5 \times 10^7$ . Наименьшее количество КОЕ было обнаружено при разрушении мембраны 3 ( $8,0 \times 10^6$ ), несколько больше высевали с коллагеновым матриксом

Miscograft —  $1,2 \times 10^7$ , с мембраны 2 высева был в 3 раза больше —  $2,5 \times 10^7$ . Результаты посева жизнеспособных клеток на 5 сутки формирования указывают на резкое увеличение КОЕ у мембран: № 3 — в 4,3 раза, Miscograft — 10 раз, при этом у мембраны 2 число КОЕ оставалось прежним. Высев после 7 суток формирования биопленок свидетельствует о снижении КОЕ у всех исследованных видов мембран. Результаты посева в показателях наглядности (за 100 % принимали наименьшее значение КОЕ) представлены на Рисунке 20. Аналогично *S.mutans*, данные по *S.aureus* и *C.albicans* представлены на Рисунках 21 и 22.

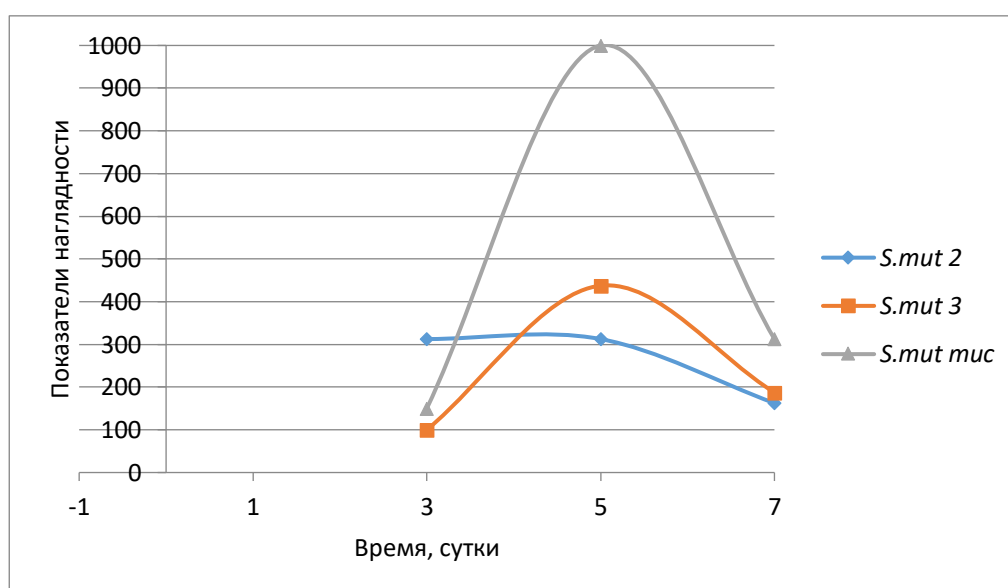


Рисунок 20 — Суточная динамика посева жизнеспособных клеток *S. mutans* из биопленок образовавшихся на мембранах (в показателях наглядности)

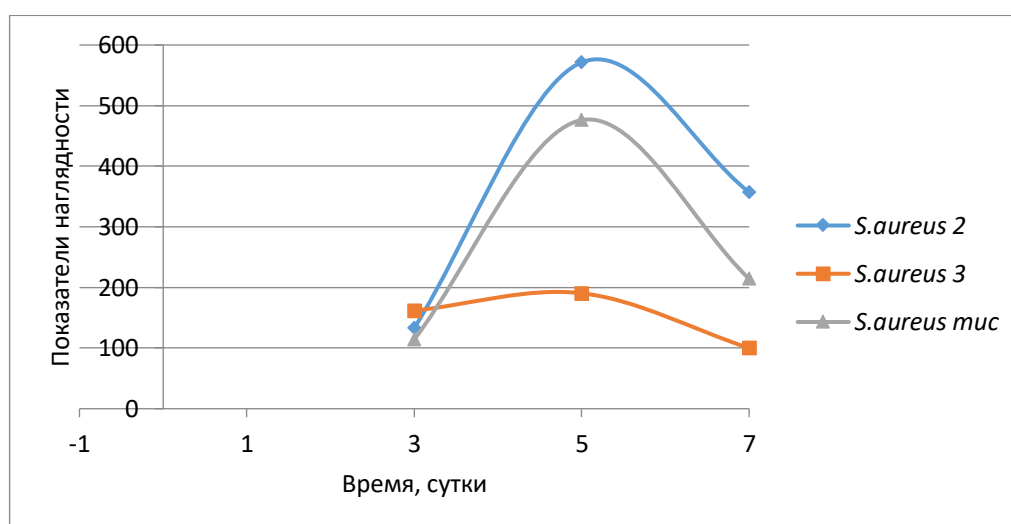


Рисунок 21 — Суточная динамика посева жизнеспособных клеток *S. aureus* из биопленок образовавшихся на мембранах (в показателях наглядности)

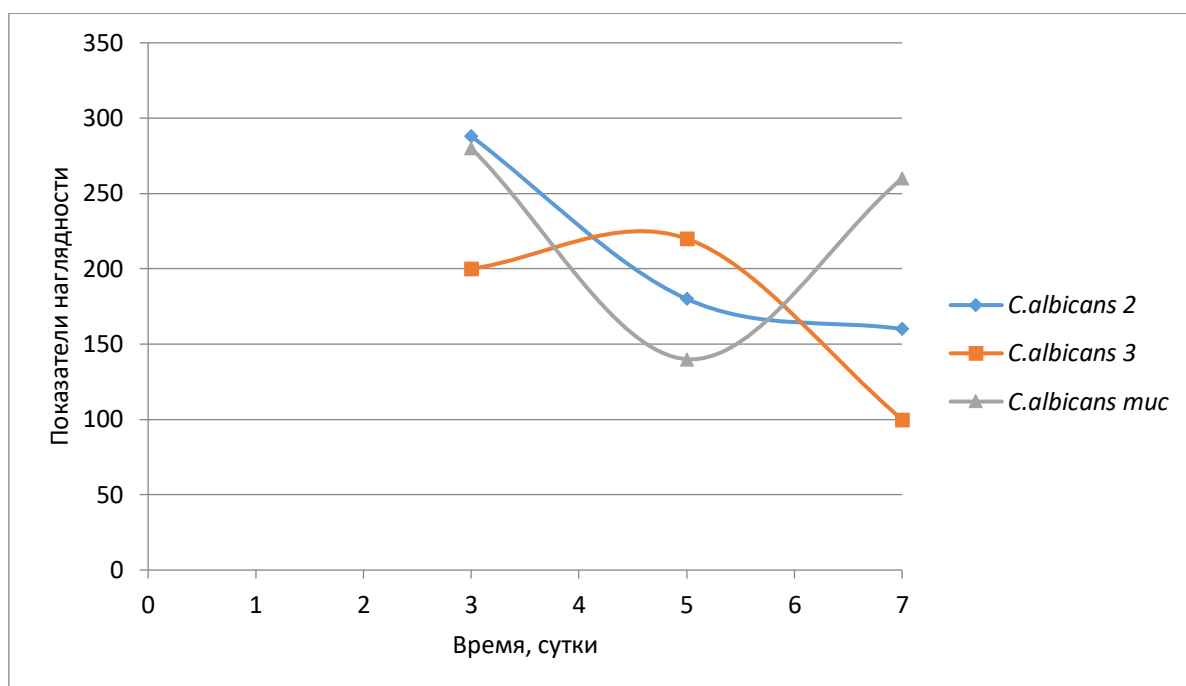


Рисунок 22 — Суточная динамика высева жизнеспособных клеток *C.albicans* из биопленок образовавшихся на мембранах (в показателях наглядности)

### Анализ влияния роста биопленок на pH 10 % раствора сахарозы

При изучении изменения pH 10 % раствора сахарозы было отмечено, что на 3 сутки исследования для бактерии *S.mutans* к 30 минуте наибольшее смещение к щелочной среде происходило в среде микроорганизмов на поверхности коллагеновой мембраны, наименьшее — для коллагеновой мембраны с лактоферрином ( $p > 0,05$ ), для *S.aureus* отмечали умеренное увеличение pH среды для мембраны с лактоферрином и для Mucograft, тогда как в случае персонализированной коллагеновой мембраны pH среды практически оставалось неизменным (около 5,5) ( $p = 0,01$ ,  $p < 0,05$ ); для *C.albicans* также, как и для *S.mutans*, наибольшее защелачивание среды отмечали для персонализированной коллагеновой мембраны, однако наименьшее влияние на pH оказывали микроорганизмы на поверхности коллагенового матрикса Mucograft ( $p = 0,002$ ,  $p < 0,05$ ) (Рисунки 23–25).

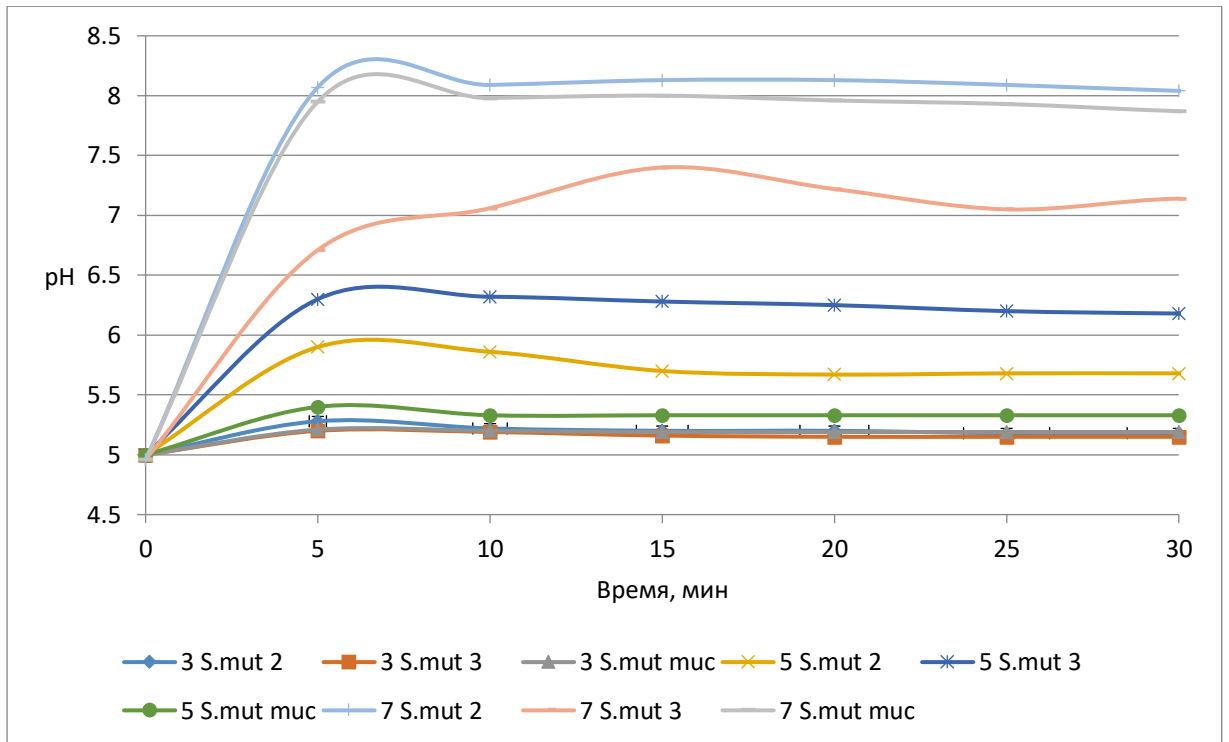


Рисунок 23 — Влияние искусственных биопленок *S.mutans* (3, 5, 7 сутки образования) с мембран (2, 3, muc) на pH 10 % раствора сахарозы

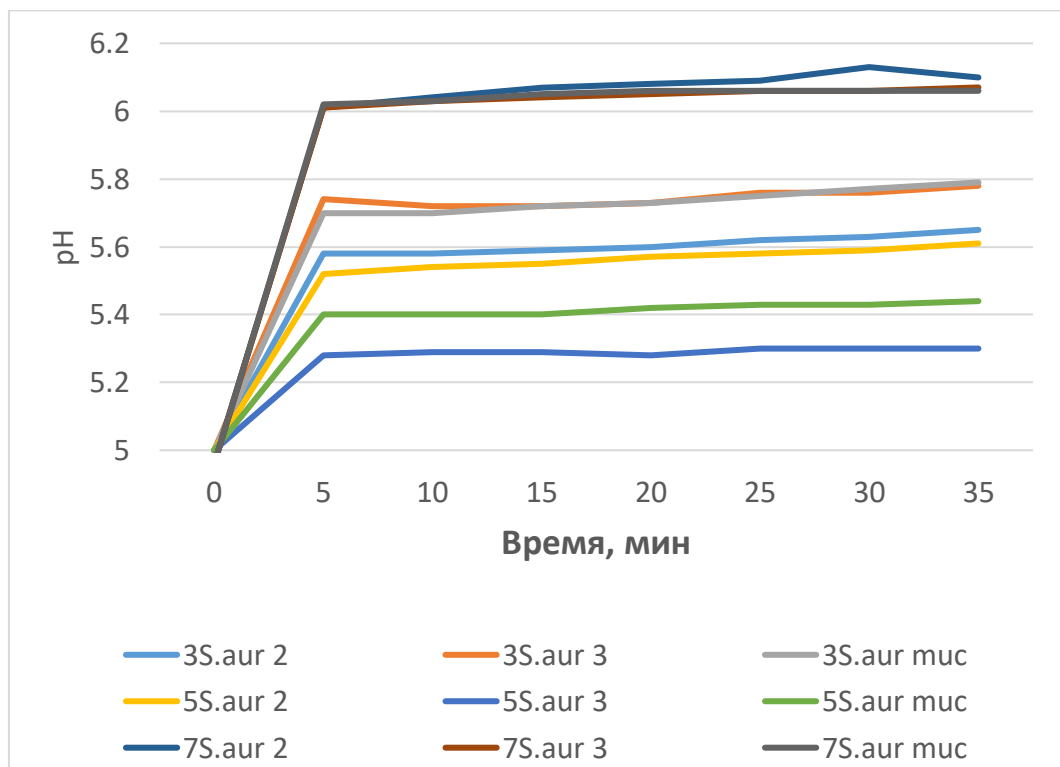


Рисунок 24 — Влияние искусственных биопленок *S.aureus* (3, 5, 7 сутки образования) с мембран (2, 3, muc) на pH 10 % раствора сахарозы

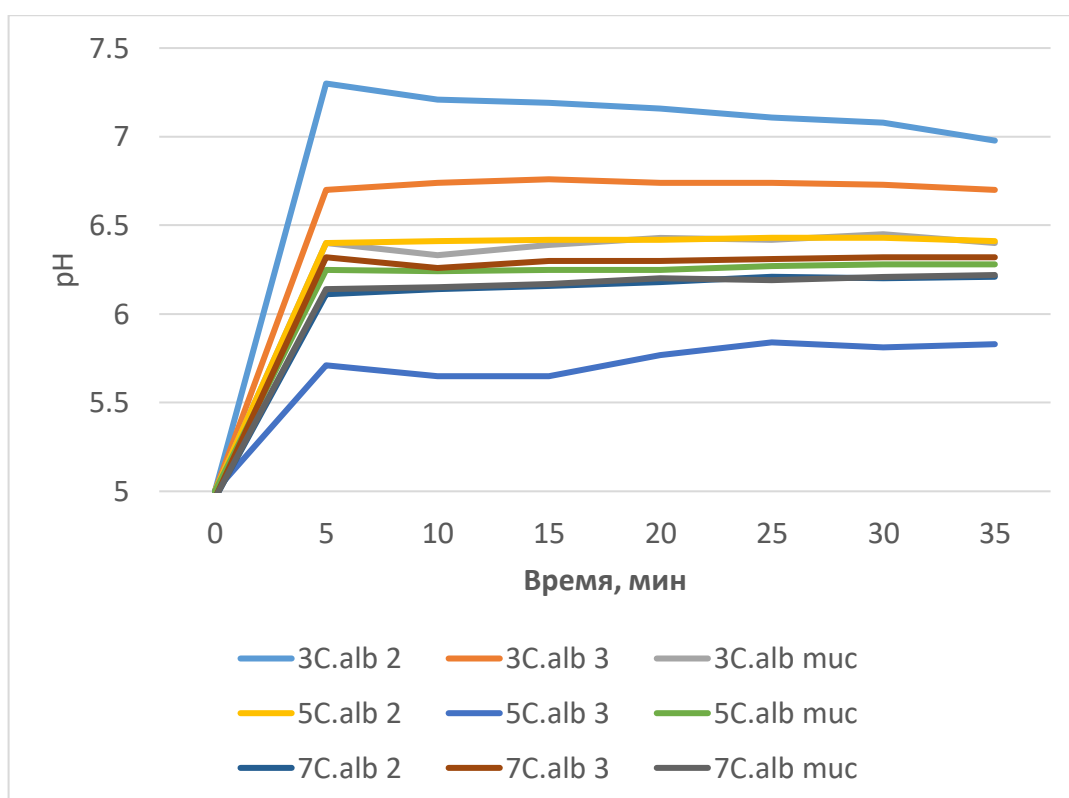


Рисунок 25 — Влияние искусственных био пленок *C.albicans* (3, 5, 7 сутки образования) с мембран (2, 3, muc) на pH 10 % раствора сахарозы

На 5 сутки исследования для *S.mutans* pH в области всех мембран снижалось и значения приближались к исходному — 5,5, однако наименьшим значением обладал коллагеновый матрикс Mucograft, наиболее высоким — персонализированная коллагеновая мембрана с лактоферрином ( $p=0,002$ ,  $p<0,05$ ); для *S.aureus* происходило повышение pH для персонализированной коллагеновой мембраны, тогда как для мембраны с лактоферрином и для Mucograft наблюдали обратный эффект — его снижение к возвращению исходных значений и некоторому закислению (для Mucograft) ( $p=0,002$ ,  $p<0,05$ ); для *C.albicans* также происходило снижение pH для всех мембран, однако наибольшим значением обладала разработанная коллагеновая мембрана, наименьшим — коллагеновая мембрана с лактоферрином ( $p=0,002$ ,  $p<0,05$ ) (Рисунки 23–25).

На 7 сутки для бактерий *S.mutans* отметили дальнейшее снижение pH среды по сравнению с исходным значением 5,5 для всех мембран с незначительным закислением ( $p=0,003$ ,  $p<0,05$ ); для *S.aureus* происходило дальнейшее защелачивание среды, большее — для персонализированной коллагеновой

мембраны, тогда как для мембраны с лактоферрином и матрикса Mucograft значения были близки ( $p=0,3$ ,  $p>0,05$ ); для *S.albicans* происходило выравнивание значения рН для всех мембран к схожим значениям, но выше изначального 5,5 ( $p=0,01$ ,  $p<0,05$ ).

Проведенный сравнительный анализ микробного роста на примере условно-патогенных микроорганизмов полости рта, колонизировавших поверхность различных коллагеновых мембран, показал их допустимые значения на всех сроках исследования (до 7 суток), что особенно важно для регенерации мягких тканей в условиях потенциальной микробной контаминации. Исследование позволило разработать достоверную систему оценки активности биопленки на поверхности коллагеновых мембран, которая может быть внедрена в клиническую практику для оценки эффективности их использования. Разработанные на базе Института регенеративной медицины коллагеновые мембраны показали сопоставимые (персонализированная коллагеновая мембрана) и значительно лучшие (коллагеновая мембрана с лактоферрином) результаты по сравнению с зарубежным аналогом и могут быть рекомендованы для клинического применения при устранении обширных дефектов слизистой оболочки рта.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Закрытие дефектов слизистой оболочки полости рта остается весьма актуальным вопросом для хирургической стоматологии и формирует определенные задачи в рамках наук экспериментальной медицины — биохимии, гистологии и других. Лечение пациентов с обширными повреждениями мягких тканей полости рта, в частности возникающих при заборе трансплантатов для проведения дентальной имплантации и направленной тканевой регенерации, связано с необходимостью разработки материалов, которые наряду с биосовместимостью и биодegradацией обладали бы высокими регенеративными свойствами и стимулировали собственные клетки к росту и пролиферации.

В последние годы активно идет экспериментальное изучение эмбриональных стволовых клеток, факторов роста, материалов различной формы и консистенции для получения объема мягких тканей в полости рта, в основном слизистой оболочки [92, 119, 196, 166]. Несмотря на огромное преимущество таких технологий, не решен до конца вопрос онкологического контроля в отношении роста применяемого клеточного продукта, что ограничивает его применение в клинической практике [105]. По этой причине наибольшее развитие с последующей перспективой использования в стоматологии имеет совершенствование уже известных ксеногенных материалов, в том числе на основе коллагена различных типов.

Целью нашей экспериментальной работы было повышение эффективности лечения пациентов с обширными операционными раневыми дефектами слизистой оболочки рта путем научного обоснования применения разработанной персонализированной коллагеновой мембраны из бычьего ахиллова сухожилия в эксперименте.

Для реализации обозначенной цели нами в эксперименте были изучены свойства разработанных на базе Института регенеративной медицины ксеногенных мембран из ахиллова сухожилия крупного рогатого скота.

Мембраны были получены в лабораторных условиях путем электроосаждения после экстракции коллагена из ахиллова сухожилия КРС с последующей персонализацией полученных матриц, в том числе за счет химической сшивки и перфорации мембран. В часть полученных мембран были введены молекулы лактоферрина. На следующем этапе проводили изучение физических свойств мембран посредством анализа прочности мембран, проведения сканирующей электронной микроскопии. Оптимальным вариантом мембраны, по результатам изучения физических свойств, стали мембраны типа «интерфейс», которые с одной своей стороны обладали непористой структурой, а с другой — открытыми порами, при этом на срезе интерфейс был пористым. Такая структура матрицы идеально подходит для регенерации эпителиальных структур, поскольку по непористой поверхности происходит наиболее быстрая эпителизация, а с другой стороны — в пористую поверхность наиболее быстро врастают клетки и сосуды.

Подобная структура характерна для некоторых дорогостоящих коллагеновых матриц зарубежного производства. Так, зачастую при создании сложных скаффолдов с высоким регенеративным потенциалом в отношении слизистой оболочки полости рта применяют коллагеновый матрикс Mucograft, зарегистрированный компанией «Geistlich» (Баден-Баден, Германия). Данная коллагеновая матрица состоит из несшитого коллагена I и III типов. Довольно часто ее применяют в хирургической стоматологии в качестве каркаса при направленной тканевой регенерации [98].

По результатам наших исследований и анализу ИК-спектроскопии, основным компонентом мембран являлся коллаген I типа, что согласовывается со структурой большинства применяемых в стоматологии ксеногенных коллагеновых мембран [88, 121].

Анализ цитотоксичности полученных коллагеновых мембран *in vivo* на культурах клеток NIH 3T3 и МСК из пуповины, согласно экстракционному тесту с Аламаровым и Пикогрином, показал, что сшивка химическим агентом не повлияла на токсические свойства персонализированного коллагена. Жизнеспособность клеток для нулевой концентрации и трехкратной концентрации была одинаковой

для персонализированного коллагена; аналогично количество клеток (их ДНК), согласно тесту с Пикогрином, было одинаково для нулевой и трехкратной концентрации экстракта из персонализированных матриц [1]. Таким образом, даже максимальные количества экстрактов из коллагеновых матриц не снизили ни пролиферативную, ни метаболическую активность клеток, как это наблюдалось в случае положительного контроля SDS.

Полученные результаты согласуются с общемировыми [204]. Так, в обзорной статье говорится о преобладании воздействия коллагеновой матрицы на моноклеарные клетки с их физиологической активацией, что обеспечивает хороший регенеративный эффект без каких-либо нежелательных реакций [197].

С целью изучения биологических свойств разработанных мембран для устранения дефекта мягких тканей в полости рта было проведено экспериментальное исследование на лабораторных животных (кролики) на базе Центрального Вивария Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет) [6].

В исследование включили 12 лабораторных животных — половозрелых самцов кроликов породы «Советская шиншилла» весом 3–3,5 кг.

Всем животным в условиях общего обезболивания на слизистой оболочке рта в области твердого неба и фронтальной группы зубов (по типу вестибулопластики на верхней челюсти) слева и справа от средней линии создавали симметричные дефекты размером по 0,5 см на 0,5 см. Заживление слева (группа исследования) проходило в условиях использования биорезорбируемых мембран из персонализированного коллагена, дефекты справа (группа сравнения) заживали вторичным натяжением. Было установлено 12 коллагеновых мембран, разработанных в Институте регенеративной медицины Сеченовского университета (n=6 — персонализированный коллаген, n=6 — персонализированный коллаген с лактоферрином).

Послеоперационный контроль осуществляли на 3, 5, 7 и 14 сутки в связи с их информативностью для оценки регенерации мягких тканей в полости рта.

В послеоперационном периоде на 3-е сутки в полости рта экспериментальных животных отмечали умеренный отек в области проведения вестибулопластики как при использовании мембран, так и на стороне без их применения. На 5-е сутки в полости рта у экспериментальных животных сохранялся незначительный отек в зоне проведения вестибулопластики и на твердом небе в группе применения мембран с лактоферрином и без него. Гиперемию не определяли или она была незначительной в группе животных с применением мембран с лактоферрином, в группе использования мембран без него гиперемия была умеренной и даже выраженной. Наиболее значимые отек и гиперемия наблюдали на стороне оперативного вмешательства, где эпителизация проходила вторичным заживлением. На 7-е сутки значимых признаков воспалительного процесса не наблюдали ни в одной из групп. В этом же периоде в области твердого неба отмечали интенсификацию процесса эпителизации, что было особенно выражено в группе применения мембран. Эпителизация в большей степени протекала в области твердого неба по сравнению с областью вестибулопластики, однако без существенных различий между контрольной стороной и стороной применения коллагеновых мембран ( $p < 0,05$ ). Полную эпителизацию раневого дефекта с вестибулярной стороны отмечали при использовании коллагеновой матрицы с лактоферрином, сопоставимые результаты в области твердого неба были получены для всех разработанных коллагеновых мембран и коммерческого матрикса Mucograft. Полученные данные согласовываются с результатами моделирования раневого дефекта в полости рта у лабораторных животных [188].

Для оценки регенерации и выраженности воспаления в области проведенных операций проводили гистологическое исследование биоматериала, полученного из всех областей вмешательства в полости рта лабораторных животных в пределах интактных тканей.

В каждом препарате оценивали признаки воспаления (экссудация, инфильтрация иммунными клетками, микроциркуляторные нарушения) и

регенерации (неоангиогенез, пролиферация фибробластов, зрелость грануляционной ткани) по 4-балльной шкале.

Также проводили иммуногистохимическое исследование срезов образцов тканей, фиксированные в 10 % нейтральном забуференном формалине и залитые в парафиновые блоки, толщиной 3–4 микрометра [35].

По результатам проведенного гистологического исследования отмечали формирование новых зрелых мягких тканей в более полном объеме с вестибулярной стороны и на твердом небе при применении разработанных коллагеновых мембран, однако в случае новых мембран плотность на единицу площади вновь образованных кровеносных сосудов была значительно выше, чем в случае матрикса Mucograft, что косвенно говорит о качестве регенерата и может гарантировать сохранение объема тканей в отдаленном послеоперационном периоде. Полученные данные созвучны с исследованием Кулакова А. А. (2021) по экспериментальному исследованию биологических свойств коллагеновых мембран и скаффолдов [40].

В ранее проведенных похожих исследованиях, например, Кулаков А. и соавт. (2021) [40] для усиления регенеративных свойств коллагеновых матриксов применяли заселение их поверхности стволовыми мезенхимальными клетками в эксперименте инъекционным методом, а используемыми матриксами являлись Mucograft and Mucoderm matrices. Материал имплантировали под слизистую оболочку или создавали ее дефект с подшиванием мембраны на его поверхности. Выведение животных проводили на 7-е сутки после операции с дальнейшим гистологическим анализом биологических образцов, в том числе с определением различных факторов роста (VEGF, IGF1, and TGF). Применение Mucoderm показало лучшие результаты по сравнению с Mucograft, а внесение стволовых клеток было эффективно для стимуляции регенерации мягких тканей вне зависимости от применяемой мембраны, в том числе за счет ускорения васкуляризации и эпителиального ответа.

Sanz-Martin I. и соавт. (2018) провели экспериментальное исследование на собаках с целью сравнительного анализа эффективности трех регенеративных

методов, применяемых для изменения контура мягких тканей при хронических дефектах альвеолярного гребня челюстей [96]. Во время оперативного лечения после создания дефекта кости с вестибулярной стороны применяли для их устранения смещенный костный трансплантат, резорбируемую коллагеновую мембрану, а также их сочетание. Для анализа изменения мягких тканей проводили цифровое сканирование слепков челюстей и в полости рта лабораторных животных. После создания дефектов большая часть потери тканей происходила ниже на 4 и 6 мм от десневого края: в области мезиальной стороны дефекта среднее горизонтальной потери кости в случае применения обоих материалов составило  $0,47 \pm 0,34$  мм, для костного трансплантата —  $0,79 \pm 0,67$  мм и для коллагеновой мембраны —  $0,87 \pm 0,69$  мм; с медиальной стороны дефекта среднее потери кости составило  $0,11 \pm 0,31$  мм,  $1,01 \pm 0,91$  мм и  $0,98 \pm 0,49$ , соответственно. По данным авторов, для дистальной стороны дефекта лучшие результаты были получены в случае применения обоих материалов и изолированной коллагеновой мембраны по сравнению с костным трансплантатом ( $0,24 \pm 0,72$  и  $0,86 \pm 0,56$ ,  $1,04 \pm 0,92$ , соответственно). При парном сравнении методов схожие результаты были получены для мембран и костных трансплантатов, тогда как использование обеих методик значительно превалировало над их отдельным применением при увеличении горизонтального объема мягких тканей в полости рта. На основании полученных результатов авторы сделали вывод о необходимости дополнительного использования коллагеновых мембран при применении костных трансплантатов в реконструктивной хирургии в полости рта [96]. По сравнению с нашим исследованием, несмотря на непосредственную цель в виде увеличения объема мягких тканей полости рта в эксперименте, авторы больший акцент делали на общем итогом объеме тканей челюстей при создании дефектов кости, а не на изучении структуры и параметров именно слизистой оболочки рта.

С целью изучения потенциального влияния микрофлоры пациентов на результаты операций в полости рта при «открытом» использовании коллагеновых мембран проводили сравнительный анализ микробного роста на поверхности полученных коллагеновых мембран при «заселении» их поверхности штаммами

условно-патогенных микроорганизмов полости рта [6]. На предварительном этапе было выполнено исследование состава микроорганизмов полости рта. По результатам исследования проб из полости рта наиболее часто и в большом объеме выделяли различные виды стрептококков, стафилококков, а также грибы рода *Candida*. Для проведения экспериментов были выбраны *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*, как наиболее клинически значимые. По этой причине в исследования были включены штаммы микроорганизмов из Уникальной научной установки «Коллекция НИИВС им. И. И. Мечникова». Получение видовых биопленок проводили по определенному протоколу.

Исследование образовавшихся биопленок на поверхности мембран выполняли на 3, 5, 7 сутки. В исследовании изучали мембраны трех видов: 2 полученные на базе Сеченовского Университета (коллагеновую мембрану и коллагеновую мембрану с лактоферрином) и 1 в качестве контроля — коллагеновый матрикс *Mucograft* (*Geistlich*, Швейцария).

Контроль образования биопленок осуществляли визуально и готовили препараты — мазки с окраской по Граму. Таким образом, все исследуемые образцы разделили на 4 группы по 3 образца в каждой: 1-я (контрольная) — в которой анализировали характер роста бактерий без их помещения на поверхность коллагеновой мембраны; 2-я — микробный рост на поверхности персонализированной коллагеновой мембраны; 3-я — рост бактерий на поверхности коллагеновой мембраны с лактоферрином; 4-я (сравнения) — микробный рост на поверхности коллагенового матрикса *Mucograft* [6]. Результаты посева жизнеспособных клеток микроорганизмов (*S.mutans*, *S.aureus*, *C.albicans*) на 5 сутки формирования указывали на резкое увеличение КОЕ у мембран: № 3 — в 4,3 раза, *Mucograft* — 10 раз, при этом у мембраны 2 число КОЕ оставалось прежним. Высев после 7 суток формирования биопленок свидетельствовал о снижении КОЕ у всех исследованных видов мембран. Схожие результаты были получены для других микроорганизмов. В доступной литературе мы не нашли подобных исследований.

Проведенное экспериментальное исследование показало конкурентоспособность разработанных коллагеновых мембран на основе ахиллова сухожилия по сравнению с существующими аналогичными коллагеновыми матрицами, выбор которых не так велик, а при устранении обширных дефектов слизистой оболочки рта с переменным успехом применяют матрикс Mucograft. Клинически не было получено существенных статистически значимых различий между разработанными мембранами, контрольной матрицей и заживлением вторичным натяжением, однако по данным гистологического исследования лучшие результаты в отношении полноты и зрелости вновь образованных мягких тканей были получены для мембран с лактоферрином, а для персонализированного коллагена были схожи со случаями применения Mucograft.

При изучении образцов неба и вестибулярной части челюсти с имплантированными в них коммерческого матрикса и разработанных мембран 2-х типов (Mucograft, коллагеновая без и с лактоферрином) наблюдали различные изменения. При использовании Mucograft репаративные процессы, формирование соединительной ткани и неоангиогенез шли умеренным темпом и были заметны преимущественно на периферии имплантата, некротических и воспалительных изменений не отмечали. При имплантации мембраны из персонализированного коллагена присутствовали выраженные некротические и иммунные реакции, формирование соединительной ткани и сосудов было медленным. При использовании мембраны из персонализированного коллагена с добавлением лактоферрина отмечали уменьшение выраженности некротических процессов и иммунных реакций, а также более интенсивное формирование и созревание коллагеновых волокон в месте имплантации и образование сосудов.

В результате исследования ростовых свойств использованных в исследовании штаммов микроорганизмов можно констатировать незначительные отличия в продолжительности основных фаз роста и способности накопления биомассы. Схожие ростовые свойства штаммов различных родов и видов в планктонной культуре могут иметь существенные различия при формировании биопленок.

Таким образом, по результатам комплексного изучения физических и биологических свойств новых разработанных коллагеновых матриц из ахиллова сухожилия можно констатировать их высокую конкурентную способность с лидерами рынка аналогичных материалов в хирургической стоматологии при значительном превалировании антибактериальной устойчивости, что особенно важно при проведении операций в полости рта.

## ВЫВОДЫ

1. Изучение механических свойств разработанных коллагеновых мембран, в том числе с лактоферрином, продемонстрировало высокие показатели прочности на разрыв ( $5,8 \pm 1,3$  МПа) и удлинение при разрыве ( $80,8 \pm 11$  %).

2. По данным клинических методов исследования более благоприятное течение послеоперационного периода отмечали в случае закрытия обширных раневых дефектов слизистой оболочки рта лабораторных животных биорезорбируемыми мембранами из персонализированного коллагена и коллагенового матрикса Mucograft, чем при заживлении вторичным натяжением. Разница показателей выраженности отека составила в среднем 0,3–0,5 балла, гиперемии – 0,2–0,5 балла ( $p > 0,05$ ), полнота эпителизации операционного дефекта в среднем отличалась на 5–7 % ( $p < 0,001$ ).

3. По данным морфологического метода исследования было отмечено значительное различие в количестве и качестве вновь образовавшихся мягких тканей в области применения коллагеновых мембран по сравнению с заживлением вторичным натяжением ( $p < 0,001$ ); при сравнении результатов между мембранами большее количество вновь образованных кровеносных сосудов (медиана показателя) было выявлено при использовании разработанных коллагеновых мембран (как с лактоферрином, так и без него), которые были схожи с таковыми для матрикса Mucograft или превышало его (490, 560 и 410 на кв. мм, соответственно,  $p < 0,001$ ).

4. По данным микробиологического исследования более интенсивное снижение обсемененности патогенными микроорганизмами (*S.aureus*, *S.mutans*, *C.albicans*) продемонстрировали персонафицированные мембраны с лактоферрином, хотя отличия в продолжительности основных фаз роста и способности накопления биомассы для всех коллагеновых мембран и коллагенового матрикса Mucograft были незначительны ( $p < 0,001$ ).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При получении коллагеновых мембран из ахиллова сухожилия крупного рогатого скота методом электроосаждения рекомендуется проводить анализ состава полученных материалов, а также дополнительную их персонализацию за счет сшивки и создания перфораций для получения более механически устойчивых структур — модификации «интерфейс».

2. Для дополнительной стимуляции регенерации мягких тканей полости рта лабораторных животных в эксперименте рекомендовано в состав коллагеновых мембран вводить молекулы лактоферрина.

3. По результатам проведенных исследований рекомендовано применять мембраны из персонализированного коллагена для устранения дефектов слизистой оболочки рта, в том числе при проведении вестибулопластики и закрытия раневых дефектов на твердом небе.

4. С учетом микробиологического исследования по адгезии микроорганизмов к поверхности изучаемых мембран в условиях высокого потенциального риска инфицирования раневой поверхности полости рта рекомендуется применять мембраны из персонализированного коллагена с лактоферрином.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АМП — антимикробные пептиды

БАВ — биологически активные вещества

ДКТ — двухэнергетическая компьютерная томография

КЛКТ — конусно-лучевая компьютерная томография

ЛФ — лактоферрин

НКР — направленная костная регенерация

НТР — направленная тканевая регенерация

ПКР — плоскоклеточный рак

ПТФЭ — политетрафторэтилен

рчЛФ — рекомбинантный человеческий лактоферрин

чЛФ — человеческий лактоферрин

GFP — зеленый флуоресцентный белок

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антошин, А. А. Биодegradируемые матрицы на основе фибриллярного коллагена для аугментационной уретропластики: дис. ... кандидата биологических наук: 1.1.10. / Антошин Артем Анатольевич ; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). — Москва, 2023. — 167 с. : ил.
2. Бадалян, В. А. Хирургический протокол: особенности применения коллагенового матрикса MUCOGRAFT при проведении операции вестибулопластики в области нижней челюсти / В. А. Бадалян, И. М. Баулин, Н. В. Романенко // Российская стоматология. — 2013. — Т. 6. — № 4. — С. 32–37.
3. Баулин, И. М. Экспериментальное исследование коллагеновой матрицы для увеличения объема десны с использованием 3D-моделирования / И. М. Баулин, В. А. Бадалян, А. Н. Ряховский // Стоматология. — 2015. — Т. 94. — № 5. — С. 8–10.
4. Беспалова, Н. А. Возможности хирургического устранения и профилактики рецессии десны с использованием различных видов трансплантационной техники / Н. А. Беспалова, Е. А. Дурново, С. В. Шашурина // Медицинский альманах. — 2015. — № 3 (38). — С. 150–155.
5. Биорезорбируемые коллагеновые материалы в хирургии: 50 лет успеха / А. Л. Файзуллин, А. Б. Шехтер, Л. П. Истранов [и др.] // Сеченовский вестник. — 2020. — № 11 (1). — С. 59–70.
6. Благушина, Н. А. Сравнительный анализ применения биорезорбируемых мембран из ксеноперикарда и коллагеновой пленки при закрытии послеоперационных дефектов слизистой оболочки рта: экспериментальное исследование: дис. ... кандидата медицинских наук : 14.01.14 / Благушина Наталия Алексеевна ; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). — Москва, 2022. — 160 с.

7. Быков, В. Л. Гистология и эмбриология органов полости рта человека / Быков В. Л. ; — СПб. : «Специальная литература», 1998. — 248 с. — ISBN 5-86457-089-3. — Текст : непосредственный.

8. Гистологические результаты использования коллагенового матрикса для увеличения ширины кератинизированной прикрепленной десны в области дентальных имплантатов / С. В. Тарасенко, А. Б. Шехтер, И. П. Ашурко [и др.] // Российская стоматология. — 2015. — № 8 (2). — С. 4–9.

9. Гурин, А. Н. Новый вид остеопластических материалов на основе октакальцийфосфата и биорезорбируемых мембран на основе альгината: разработка, экспериментальное обоснование, клиническое внедрение : дис. ... доктора медицинских наук : 14.01.14 / Гурин Алексей Николаевич ; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). — Москва, 2021. — 267 с. : ил.

10. Диденко, И. Ю. Нормативные критерии структурно-функциональной изменчивости слизистой оболочки нижней губы (по данным прижизненных хейлостоматоскопических исследований) : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.01.14 / Диденко Ирина Юрьевна ; ГОУВПО «Воронежская государственная медицинская академия». — Воронеж, 2011. — 159 с. : ил.

11. Диденко, И. Ю. Структурно-функциональная организация слизистой оболочки полости рта у человека в норме / И. Ю. Диденко, А. В. Петров, В. В. Спицин // Журнал анатомии и гистопатологии. — 2012. — Т. 1. — № 4. — С. 9–24.

12. Дьячкова, Е. Ю. Хирургическое лечение пациентов с хроническим перфоративным гайморитом с применением различных форм ксеногенного материала на основе коллагена / Е. Ю. Дьячкова, С. В. Тарасенко, С. С. Дыдыкин // Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2019. — Т. 14. — № 4. — С. 628–630.

13. Заболевания слизистой оболочки полости рта / Н. Ф. Данилевский, В. К. Леонтьев, А. Ф. Несин [и др.] ; — Москва : ОАО «Стоматология», 2001. — ISBN 5-89599-018-7. — Текст : непосредственный.

14. Зукелли, Д. Пластическая хирургия мягких тканей полости рта / Д. Зукелли ; — Москва: Азбука, 2014. — 816 с. — ISBN 978-5-91443-030-3. — Текст : непосредственный.

15. Использование свободного лучевого лоскута для замещения сложных послеоперационных дефектов при комбинированном и комплексном лечении больных местно-распространенным плоскоклеточным раком полости рта / Х. Чень, А. М. Мудунов, Р. И. Азизян [и др.] // Опухоли головы и шеи. — 2022. — № 10 (1). — С. 55–64.

16. Коняева, А. Д. Эффективность использования нетканых пьезоэлектрических полимерных мембран на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом для закрытия раневых дефектов слизистой оболочки полости рта / А. Д. Коняева // Журнал анатомии и гистопатологии. — 2020. — Т. 9. — № 2. — С. 40–45.

17. Кулаков, О. Б. Методы формирования кератинизированной слизистой оболочки в области дентальных имплантатов при протяженных дефектах альвеолярной кости / О. Б. Кулаков, Т. С. Хачатрян. — Текст : непосредственный // Паринские чтения 2020. Актуальные вопросы диагностики, лечения и диспансеризации пациентов с хирургической патологией челюстно-лицевой области и шеи. — 2020. — С. 51–55.

18. Мележечкина, И. А. Сравнительная морфологическая оценка качества биоинтеграции сшитых и несшитых ксеногенных материалов / И. А. Мележечкина, В. Г. Атрушкевич, Г. Н. Берченко // Пародонтология. — 2022. — Т. 27. — № 4. — С. 288–297.

19. Мележечкина, И. А. Сравнительная оценка эффективности аугментации мягких тканей десны при использовании сшитых и несшитых ксеногенных материалов / И. А. Мележечкина, В. Г. Атрушкевич // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2022. — № 21 (S2). — С. 41–42.

20. Методика оценки активности лактоферрина в эксперименте с автоматизированным культивированием стафилококка / В. Н. Царев,

И. Л. Гольдман, Е. Р. Садчикова [и др.] // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. — 2021. — С. 258–261.

21. Модифицирование химической структуры, морфологии и цитосовместимости пленок хитозана в низкочастотной плазме / Т. С. Демина, П. Ю. Бикмулина, А. В. Бирдибекова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 2022. — Т. 58. — № 2. — С. 132–139.

22. Мочалова, Д. А. Экспериментально-клиническое изучение особенностей регенерации слизистой оболочки полости рта с использованием полимерной мембраны : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 14.01.14 / Мочалова Дарья Александровна ; Нижегородская государственная медицинская академия. — Нижний Новгород, 2015. — 158 с.

23. Новые возможности хирургического лечения плоскоклеточного рака полости рта и глотки в Республике Беларусь: трансоральные лазерные резекции / Ж. В. Колядич, Н. М. Тризна, Д. Л. Ена [и др.] // Медицинские новости. — 2021. — № 5 (320). — С. 45–47.

24. Оценка клинической эффективности применения свободного соединительнотканного трансплантата и коллагенового матрикса для увеличения толщины мягких тканей в области дентальных имплантатов / И. П. Ашурко, С. В. Тарасенко, А. В. Есяян [и др.] // Пародонтология. — 2022. — № 27 (2). — С. 117–125.

25. Оценка регенераторного потенциала альвеолярно-периодонтальных дефектов / А. И. Яременко, С. П. Рубникович, Д. М. Нейзберг [и др.] // Известия Национальной академии наук Беларуси. — 2021. — Серия медицинских наук. — № 18 (3). — С. 304–314.

26. Профилактика и лечение патологии костной ткани при злокачественных новообразованиях / С. Г. Багрова, Е. М. Басин, А. К. Валиев [и др.] // Злокачественные опухоли. — 2022. — № 12 (3s2–2). — С. 40–54.

27. Рачков, А. А. Особенности применения барьерных мембран в условиях микробной контаминации операционных ран полости рта / А. А. Рачков, Т. Л. Шевела, В. Л. Евтухов // Стоматолог. — Минск. — 2018. — № 2. — С. 87–89.

28. Сравнительный анализ роста условно-патогенных микроорганизмов полости рта на поверхности коллагеновых мембран: экспериментальное исследование / О. А. Свитич, А. В. Поддубиков, П. С. Тимашев [и др.] // Пародонтология. — 2023. — Т. 28. — № 4. — С. 337–346.

29. Сравнительный анализ эффективности применения различных методов аугментации мягких тканей в области дентальных имплантатов / И. П. Ашурко, М. Л. Магдалянова, А. И. Галяс [и др.] // Пародонтология. — 2023. — № 28 (3). — С. 286–295.

30. Субментальный кожно-мышечный лоскут при реконструкции дефектов органов полости рта после расширенно-комбинированных резекций / Н. В. Коваленко, А. Ю. Ненарокомов, А. И. Иванов [и др.] // Креативная хирургия и онкология. — 2021. — № 2. — С. 132–137.

31. Тарасенко, С. В. Гистологическая оценка использования биорезорбируемых коллагеновых мембран при закрытии раневых дефектов слизистой оболочки рта в эксперименте / С. В. Тарасенко, Н. А. Благушина // Вятский медицинский вестник. — 2022. — № 1 (73). — С. 67–75.

32. Тарасенко, С. В. Обзор методик и материалов, используемых для увеличения объема десны / С. В. Тарасенко, С. В. Загорский // Клиническая практика. — 2019. — № 10 (1). — С. 57–62.

33. Тарасенко, С. В. Сравнительная характеристика применения аутогенных и ксеногенных материалов для аугментации десны / С. В. Тарасенко, С. В. Загорский, Е. Ю. Дьячкова // Российская стоматология. — 2019. — Т. 12. — № 1. — С. 42–46.

34. Трунин, Д. А. Опыт применения лазеров для вестибулопластики в периимплантатной зоне / Д. А. Трунин, С. И. Вырмаскин, В. В. Афанасьев // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». — 2021. — Т. 23. — № 6. — С. 87–92.

35. Файзуллин, А. Л. Применение антифибротических скаффолдов в регенеративной медицине: экспериментально-морфологическое и молекулярно-генетическое исследование: дис. ... кандидата медицинских наук: 14.03.02 / Файзуллин Алексей Леонидович ; ФГАОУ ВО Первый Московский

государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). — Москва, 2022. — 145 с. : ил.

36. Хэм, А. Гистология в пяти томах / А. Хэм, Д. Кормак ; — Москва : Мир, 1983. — Т. 3. — 292 с. — Текст : непосредственный.

37. Цур, О. Пластическая и эстетическая хирургия в пародонтологии и имплантологии / О. Цур, М. Хюрцелер ; — Москва : Азбука, 2014. — 847 с. — ISBN 978-5-91443-032-7. — Текст : непосредственный.

38. Экспериментальное обоснование применения биорезорбируемых персонализированных коллагеновых мембран для закрытия дефектов слизистой оболочки рта / М. С. Гостев, С. В. Тарасенко, С. В. Казумян [и др.] // Институт стоматологии. — 2023. — № 4 (101). — С. 126–127.

39. Экспериментальное обоснование применения биорезорбируемых персонализированных коллагеновых мембран для закрытия дефектов слизистой оболочки рта / М. С. Гостев, С. В. Тарасенко, С. В. Казумян [и др.] // Проблемы стоматологии. — 2023. — № 4 — С. 77–82.

40. Эффективность использования препарата Radiesse в стоматологической практике для профилактики и консервативного лечения рецессии десны / О. В. Шалак, Е. А. Сатыго, Р. В. Деев [и др.] // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. — Т. 14. — № 4. — 2022. — С. 43–52.

41. 18F-FDG PET and CT/MRI in oral cavity squamous cell carcinoma: A prospective study of 124 patients with histologic correlation / S.-H. Ng, T.-C. Yen, C.-T. Liao, [et al.] // Journal of Nuclear Medicine. — 2005. — № 46. — P. 1136–1143.

42. A 5-year prospective study on single immediate implants in the aesthetic zone / J. Cosyn, A. Eghbali, A. Hermans, [et al.] // Journal of Clinical Periodontology. — 2016. — № 43. — P. 702–709.

43. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development / P. Singh, M. Parsek, E. Greenberg, [et al.] // Nature. — 2002. — № 417. — P. 552–555.

44. A novel surgical-prosthetic approach for soft tissue dehiscence coverage around single implant / G. Zucchelli, C. Mazzotti, I. Mounssif, [et al.] // *Clinical Oral Implants Research*. — 2013. — № 24. — P. 957–962.

45. A short artificial antimicrobial peptide shows potential to prevent or treat bone infections / N. Bormann, A. Koliszak, S. Kasper, [et al.] // *Scientific Reports*. — 2017. — № 7. — P. 1506.

46. Accuracy of 18-F Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomographic/Computed Tomographic Imaging in Primary Staging of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity / C. Linz, R. C. Brands, T. Herterich, [et al.] // *JAMA Network Open*. — 2021. — № 4. — P. 217083.

47. Ageitos, J. M. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria / J. M. Ageitos // *Biochemical pharmacology*. — 2017. — Vol. 133. — P. 117–138.

48. Ahmed, W. Adaptive antibacterial biomaterial surfaces and their applications / W. Ahmed, Z. Zhai, C. Gao // *Materials Today Bio*. — 2019. — № 2. — P. 100017.

49. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting // F. Abasalizadeh, S. V. Moghaddam, E. Alizadeh, [et al.] // *Journal of Biological Engineering*. — 2020. — № 14. — P. 8.

50. Álvarez, S. Bacterial adhesion to collagens: implications for biofilm formation and disease progression in the oral cavity / S. Álvarez // *Critical Reviews in Microbiology*. — 2022. — Vol. 48. — № 1. — P. 83–95.

51. Amini, A. A. Recombinant human lactoferrin as a biomaterial for bone tissue engineering: Mechanism of antiapoptotic and osteogenic activity / A. A. Amini, L. S. Nair // *Advanced Healthcare Materials*. — 2014. — № 3. — P. 897–905.

52. Ammons, M. C. Mini-review: Lactoferrin: A bioinspired, anti-biofilm therapeutic / M. C. Ammons, V. Copié // *Biofouling*. — 2013. — № 29. — P. 443–455.

53. Antibacterial properties of hLf1-11 peptide onto titanium surfaces: A comparison study between silanization and surface initiated polymerization / M. Godoy-

Gallardo, C. Mas-Moruno, K. Yu, [et al.] // *Biomacromolecules*. — 2015. — № 16. — P. 483–496.

54. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use / D. Campoccia, L. Montanaro, P. Speziale, [et al.] // *Biomaterials*. — 2010. — № 31. — P. 6363–6377.

55. Antimicrobial activity of immobilized lactoferrin and lactoferricin / R. Chen, N. Cole, D. Dutta, [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research*. — 2017. — № 105. — P. 2612–2617.

56. Antimicrobial Lactoferrin Peptides: The Hidden Players in the Protective Function of a Multifunctional Protein / M. Sinha, K. Sanket, K. Punit, [et al.] // *International Journal of Peptide*. — 2013. — P. 390230.

57. Antimicrobial peptide coatings for hydroxyapatite: Electrostatic and covalent attachment of antimicrobial peptides to surfaces / L. Townsend, R. L. Williams, O. Anuforum, [et al.] // *Journal of the Royal Society Interface*. — 2017. — № 14. — P. 20160657.

58. Antimicrobial peptide melimine coating for titanium and its in vivo antibacterial activity in rodent subcutaneous infection models / R. Chen, M. D. Willcox, K. K. Ho, [et al.] // *Biomaterials*. — 2016. — № 85. — P. 142–151.

59. Antimicrobial Peptides in Biomedical Device Manufacturing / M. Riool, A. de Breij, J. W. Drijfhout, [et al.] // *Frontiers in Chemistry*. — 2017. — № 5. — P. 63.

60. Aprile, P. Membranes for Guided Bone Regeneration: A Road from Bench to Bedside / P. Aprile, D. Letourneur, T. Simon-Yarza // *Advanced Healthcare Materials*. — 2020. — № 9. — P. 2000707.

61. Arciola, C. R. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion / C. R. Arciola, D. Campoccia, L. Montanaro // *Nature Reviews Microbiology*. — 2018. — № 16. — P. 397–409.

62. Arifin, W. N. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach / W. N. Arifin, W. M. Zahiruddin // *Malaysian Journal of Medical Science*. — 2017. — Oct; 24 (5). — P. 101–105.

63. Asymmetric collagen/chitosan membrane containing minocycline-loaded chitosan nanoparticles for guided bone regeneration / S. Ma, A. Adayi, Z. Liu, [et al.] // *Scientific Reports*. — 2016. — № 6 (1). — P. 31822.
64. Bahar, A. A. Antimicrobial peptides / A. A. Bahar, D. Ren // *Pharmaceuticals*. — 2013. — № 28. — P. 1543–1575.
65. Barrier effects of new bilayer GBR membrane against bacteria invasion / R. Tsuboi, G. L. Abe, H. Kitagawa, [et al.] ; — 2020 IADR/AADR/CADR General Session (Washington, D.C., USA). — 2020. — Abstract. No. 2506.
66. Barrier membranes for tissue regeneration in dentistry / J. I. Sasaki, G. L. Abe, A. Li, [et al.] // *Biomaterial Investigations in Dentistry*. — 2021. — № 8 (1). — P. 54–63.
67. Berezcki-Temistocle, D. L. Selecting the Best Surgical Treatment Methods in Oro-Antral Communications / D. L. Berezcki-Temistocle // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. — 2022. — Vol. 19. — № 21. — P. 14543.
68. Bioactive bacterial cellulose membrane with prolonged release of chlorhexidine for dental medical application / B. S. Inoue, S. Streit, A. L. dos Santos Schneider, [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. — 2020. — № 148. — P. 1098–1108.
69. Bioactive Membrane Immobilized with Lactoferrin for Modulation of Bone Regeneration and Inflammation / L. Jinkyu, L. Jinki, L. Sangmin, [et al.] // *Tissue Engineering*. — 2020. — P. 1–15.
70. Biocompatibility, resorption and biofunctionality of a new synthetic biodegradable membrane for guided bone regeneration / A. Hoornaert, C. d'Arros, M. F. Heymann, [et al.] // *Biomedical Materials*. — 2016. — № 11 (4). — P. 045012.
71. Biodegradable polymer membranes applied in guided bone/tissue regeneration: A review / J. Wang, L. Wang, Z. Zhou, [et al.] // *Polymers*. — 2016. — № 8 (4). — P. 115.
72. Biomaterial strategies to reduce implant-associated infections / Y. Qiu, N. Zhang, Y. H. An, [et al.] // *The International Journal of Artificial Organs*. — 2007. — № 30. — P. 828–841.

73. Bone regeneration by lactoferrin released from a gelatin hydrogel / R. Takaoka, Y. Hikasa, K. Hayashi, [et al.] // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. — 2011. — № 22. — P. 1581–1589.

74. Buccal films: A review of therapeutic opportunities, formulations & relevant evaluation approaches / L. Shipp, F. Liu, L. Kerai-Varsani, [et al.] // *Journal of Controlled Release*. — 2022. — № 352. — P. 1071–1092.

75. Bunyaratavej, P. Collagen membranes: A review / P. Bunyaratavej, H. L. Wang // *Journal of Periodontology*. — 2001. — № 72 (2). — P. 215–229.

76. Cancers of the Oral Cavity and Oropharynx: FDG PET with Contrast-enhanced CT in the Posttreatment Setting / K. G. King, A. Kositwattanarek, E. Genden, [et al.] // *RadioGraphics*. — 2011. — № 31. — P. 355–373.

77. Chai, H. Synthetic Antimicrobial Peptides Exhibit Two Different Binding Mechanisms to the Lipopolysaccharides Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* / H. Chai, W. E. Allen, R. P. H. Hicks // *International Journal of Medicinal Chemistry*. — 2014. — № 2014. — P. 809283.

78. Characteristics of bacterial biofilm associated with implant material in clinical practice / V. Nandakumar, S. Chittaranjan, V. Kurian, [et al.] // *Polymer Journal*. — 2013. — № 45. — P. 137–152.

79. Characterization of hLF1-11 immobilization onto chitosan ultrathin films, and its effects on antimicrobial activity / F. Costa, S. Maia, J. Gomes, [et al.] // *Acta Biomaterials*. — 2014. — № 10. — P. 3513–3521.

80. Chen, C. H. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications / C. H. Chen, T. K. Lu // *Antibiotics*. — 2020. — № 9. — P. 24.

81. Chen, Q. Biomaterials: A Basic Introduction / Q. Chen, G. Thouas ; — CRC Press : Boca Raton, FL, USA. — 2014. — P. 63–84.

82. Cheng, G. L. Collagen Strip Technique: A Novel Approach for Ridge Preservation and Concomitant Oroantral Communication Management After Implant Explantation / G. L. Cheng, D. N. Tatakis // *Clinical Advanced in Periodontics*. — 2020. — № 10. — P. 135–139.

83. Chimerization of lactoferricin and lactoferrampin peptides strongly potentiates the killing activity against / J. Bolscher, K. Nazmi, J. van Marle, [et al.] // *Biochemistry and Cell Biology*. — 2012. — № 90. — P. 378–388.

84. Chitosan films for regenerative medicine: Fabrication methods and mechanical characterization of nanostructured chitosan films / A. De Masi, I. Tonazzini, C. Masciullo, [et al.] // *Biophysical Reviews*. — 2019. — № 11 (5). — P. 807–815.

85. Collagen barrier membranes adsorb growth factors liberated from autogenous bone chips / J. Caballe-Serrano, K. Sawada, R. J. Miron, [et al.] // *Clinical Oral Implants Research*. — 2017. — № 28 (2). — P. 236–241.

86. Collagen for bone tissue regeneration / A. M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono, [et al.] // *Acta Biomaterials*. — 2012. — № 8 (9). — P. 3191–3200.

87. Collagen-lactoferrin fibrillar coatings enhance osteoblast proliferation and differentiation / M. Vandrovcova, T. E. Douglas, S. Heinemann, [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research*. — 2015. — № 103. — P. 525–533.

88. Collagen membrane for guided bone regeneration in dental and orthopedic applications / B. Allan, R. Ruan, E. Landao-Bassonga, [et al.] // *Tissue Engineering*. — 2021. — № 27 (5–6). — P. 372–381.

89. Collins, L. M. The surface area of the adult human mouth and the thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa / L. M. Collins, C. Dawes // *Journal of Dental Research*. — 1987. — № 66. — P. 1300.

90. Combination of Calcium Hydroxyapatite Antibiotic Carrier with Cement Spacers in Peri-Prosthetic Knee Infections / V. I. Sakellariou, O. Savvidou, C. Markopoulos, [et al.] // *Surgical Infections*. — 2015. — № 16. — P. 748–754.

91. Comparative analysis of methods to increase the amount of keratinized mucosa before stage-two surgery: a randomized controlled study / S. Tarasenko, I. Ashurko, S. Taschieri, [et al.] // *Quintessence International*. — 2020. — Vol. 51. — № 5. — P. 374–387.

92. Comparative evaluation of demineralized bone matrix and type II collagen membrane versus eggshell powder as a graft material and membrane in rat model /

A. Kavarthapu, S. Malaiappan // *Indian Journal of Dental Research*. — 2019. — №30 (6). — P. 877.

93. Comparative study of nonabsorbable and absorbable barrier membranes in periodontal osseous defects by guided tissue regeneration / S. Kaushal, A. Kumar, M. A. Khan, [et al.] // *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. — 2016. — № 6 (2). — P. 111–117.

94. Comparing properties of variable pore-sized 3D-printed PLA membrane with conventional PLA membrane for guided bone/tissue regeneration / H. Y. Zhang, H. B. Jiang, J. H. Ryu, [et al.] // *Materials*. — 2019. — № 12 (10). — P. 1718.

95. Complications in the use of deepithelialized free gingival graft vs. connective tissue graft: a one-year randomized clinical trial / S. Ripoll, Á. Fernández de Velasco-Tarilonte, B. Bullón, [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. — 2021. — № 18 (9). — P. 4504.

96. Contour changes after guided bone regeneration of large non-contained mandibular buccal bone defects using deproteinized bovine bone mineral and a porcine-derived collagen membrane: an experimental in vivo investigation / I. Sanz-Martin, L. Ferrantino, F. Vignoletti, [et al.] // *Clinical Oral Investigations*. — 2018. — № 22. — P. 1273–1283.

97. Coupling Hydroxyapatite Nanocrystals with Lactoferrin as a Promising Strategy to Fine Regulate Bone Homeostasis / M. Montesi, S. Panseri, M. Iafisco, [et al.] // *PLoS ONE*. — 2015. — № 10. — P. 0132633.

98. Covalent linkage of sulfated hyaluronan to the collagen scaffold Mucograft® enhances scaffold stability and reduces proinflammatory macrophage activation in vivo / S. Al-Maawi, S. Rother, N. Halfter, [et al.] // *Bioactive Materials*. — 2022. — № 8. — P. 420–434.

99. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release / N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, [et al.] // *Chemical Reviews*. — 2016. — № 116. — P. 2602–2663.

100. Dental implants after the use of Bichat's buccal fat pad for the sealing of oro-antral communications. A case report and literature review / C. Galletti,

G. Cammaroto, F. Galletti, [et al.] // *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. — 2016. — № 8. — P. 645–649.

101. Development of layered PLGA membranes for periodontal tissue regeneration / I. Yoshimoto, J. I. Sasaki, R. Tsuboi, [et al.] // *Dental Materials*. — 2018. — № 34 (3). — P. 538–550.

102. Development of fish collagen/bioactive glass/chitosan composite nanofibers as a GTR/GBR membrane for inducing periodontal tissue regeneration / T. Zhou, X. Liu, B. Sui, [et al.] // *Biomedical Materials*. — 2017. — № 12 (5). — P. 55004.

103. Dimensions of buccal bone and mucosa at immediately placed implants after 7 years: a clinical and cone beam computed tomography study / G. I. Benic, M. Mokti, C. J. Chen, [et al.] // *Clinical Oral Implants Research*. — 2012. — № 23. — P. 560–566.

104. Discoloration of the mucosa caused by different restorative materials — a spectrophotometric in vitro study / A. Ioannidis, E. Cathomen, R. E. Jung, [et al.] // *Clinical Oral Implants Research*. — 2017. — № 28. — P. 1133–1138.

105. Drug delivery (nano) platforms for oral and dental applications: tissue regeneration, infection control, and cancer management / P. Makvandi, U. Josic, M. Delfi, [et al.] // *Advanced Science*. — 2021. — № 8 (8). — P. 2004014.

106. Dual-Energy CT in Head and Neck Imaging / E. D. Roele, V. C. M. L. Timmer, L. A. A. Vaassen, [et al.] // *Current Radiology Reports*. — 2017. — № 5. — P. 19.

107. Echazú, M. I. A. Advances in collagen, chitosan and silica biomaterials for oral tissue regeneration: from basics to clinical trials / M. I. A. Echazú // *Journal of Materials Chemistry B*. — 2016. — Vol. 4. — № 43. — P. 6913–6929.

108. Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis / G. Avila-Ortiz, S. Elangovan, K. W. Kramer, [et al.] // *Journal of Dental Research*. — 2014. — № 93. — P. 950–958.

109. Effects of bovine lactoferrin in surgically created bone defects on bone regeneration around implants / U. Görmez, M. E. Kürkcü, M. Benlidayi, [et al.] // *Journal of Oral Science*. — 2015. — № 57. — P. 7–15.
110. Effect of connective tissue grafting on peri-implant tissue in single immediate implant sites: A RCT / E. G. Zuiderveld, H. J. A. Meijer, L. den Hartog, [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2018. — № 45. — P. 253–264.
111. Effect of lactoferrin on osteogenic differentiation of human adipose stem cells / X. Ying, S. Cheng, W. Wang, [et al.] // *International Orthopaedics*. — 2012. — № 36. — P. 647–653.
112. Effects of soft tissue augmentation procedures on peri-implant health or disease: A systematic review and meta-analysis / D. S. Thoma, N. Naenni, E. Figuro, [et al.] // *Clinical Oral Implants Research*. — 2018. — № 29 (Suppl 15). — P. 32–49.
113. Efficacy of soft tissue augmentation around dental implants and in partially edentulous areas: a systematic review / D. S. Thoma, B. Buranawat, C. H. Hammerle, [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2014. — № 41(Suppl 15). — P. 77–91.
114. Electrophoretically Co-Deposited Collagen–Lactoferrin Membranes with Enhanced Pro-Regenerative Properties for Oral Soft Tissue Regeneration / A. Antoshin, M. Gostev, Y. Khristidis, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — № 24 (24). — P. 17330.
115. Electrospun PLGA/PCL/OCP nanofiber membranes promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) / Z. Wang, R. Liang, X. Jiang, [et al.] // *Materials Science and Engineering*. — 2019. — № 104. — P. 109796.
116. Elsbach, P. What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? / P. Elsbach // *Journal of Clinical Investigations*. — 2003. — № 111. — P. 1643–1645.
117. Engineered Chimeric Peptides as Antimicrobial Surface Coating Agents toward Infection-Free Implants / H. Yazici, M. B. O’Neill, T. Kacar, [et al.] // *ACS Applied Materials and Interfaces*. — 2016. — № 8. — P. 5070–5081.

118. Esen, A. Management of Large Oroantral Fistulas Caused by Medication-Related Osteonecrosis with the Combined Sequestrectomy, Buccal Fat Pad Flap and Platelet-Rich Fibrin // A. Esen, S. Akkulah // *Journal of Maxillofacial Oral Surgery*. — 2021. — № 20. — P. 76–82.
119. Ex vivo cultivated oral mucosal epithelial cell transplantation for limbal stem cell deficiency: a review / J. V. Cabral, C. J. Jackson, T. P. Uthem, [et al.] // *Stem cell research & therapy*. — 2020. — № 11(1). — P. 1–13.
120. Extraction socket preservation with or without membranes, soft tissue influence on post extraction alveolar ridge preservation: A systematic review / R. Faria-Almeida, I. Astramskaite-Januseviciene, A. Puisys, [et al.] // *Journal of Oral Maxillofacial Research*. — 2019. — № 10. — P. 5.
121. Fabrication and characterization of chitosan-collagen membrane from barramundi (*latas calcarifer*) scales for guided tissue regeneration / A. Susanto, M. H. Satari, B. Abbas, [et al.] // *European Journal of Dentistry*. — 2019. — № 13 (03). — P. 370–375.
122. Fabrication of novel poly(lactic acid/caprolactone) bilayer membrane for GBR application / G. L. Abe, J. I. Sasaki, C. Katata, [et al.] // *Dental Materials*. — 2020. — № 36 (5). — P. 626–634.
123. Factors affecting soft tissue level around anterior maxillary single-tooth implants / K. Nisapakultorn, S. Suphanantachat, O. Silkosessak, [et al.] // *Clinical Oral Implants Research*. — 2010. — № 21. — P. 662–670.
124. Farah, C. Narrow Band Imaging-guided resection of oral cavity cancer decreases local recurrence and increases survival / C. Farah // *Oral Diseases*. — 2018. — № 24. — P. 89–97.
125. Formulation for Oral Delivery of Lactoferrin Based on Bovine Serum Albumin and Tannic Acid Multilayer Microcapsules / E. Kilic, M. V. Novoselova, S. H. Lim, [et al.] // *Scientific Reports*. — 2017. — № 7. — P. 44159.
126. Functionalization of hydrophobic surfaces with antimicrobial peptides immobilized on a biointerfacial layer / Y. R. Corrales-Ureña, Z. Souza-Schiaber, P. N. Lisboa-Filho, [et al.] // *RSC Advances*. — 2020. — № 10. — P. 376.

127. Goktas, S. Biomechanical Behavior of Oral Soft Tissues / S. Goktas, J. J. Dmytryk, P. S. McFetridge // *Journal of Periodontology*. — 2011. — № 82. — P. 1178–1186.
128. González-Chávez, S. A. Lactoferrin: Structure, function and applications / S. A. González-Chávez, S. Arévalo-Gallegos, Q. Rascón-Cruz // *International Journal of Antimicrobial Agents*. — 2009. — № 33. — P. 1–8.
129. Guided bone regeneration for the reconstruction of alveolar bone defects / A. Khojasteh, L. Kheiri, S. R. Motamedian, [et al.] // *Annals of Maxillofacial Surgery*. — 2017. — № 7 (2). — P. 263–277.
130. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment / A. Turri, I. Elgali, F. Vazirisani, [et al.] // *Biomaterials*. — 2016. — № 84. — P. 167–183.
131. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited / I. Elgali, O. Omar, C. Dahlin, [et al.] // *European Journal of Oral Science*. — 2017. — № 125 (5). — P. 315–337.
132. Hämmerle, C. H. Osteology Consensus G. Evidence-based knowledge on the biology and treatment of extraction sockets / C. H. Hämmerle, M. G. Araujo, M. Simion // *Clinical Oral Implants Research*. — 2012. — № 23 (Suppl 5). — P. 80–82.
133. Head and neck effective dose and quantitative assessment of image quality: A study to compare cone beam CT and multislice spiral CT / C. Nardi, C. Talamonti, S. Pallotta, [et al.] // *Dentomaxillofacial Radiology*. — 2017. — № 46. — P. 20170030.
134. Histologic, histomorphometric, and osteogenesis comparative study of a novel fabricated nanocomposite membrane versus cytoplasmic membrane / A. Haghghat, S. Shakeri, M. Mehdikhani, [et al.] // *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. — 2019. — № 77 (10). — P. 2027–2039.
135. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation / J. Overhage, A. Campisano, M. Bains, [et al.] // *Infection and Immunity*. — 2008. — № 76. — P. 4176–4182.

136. Human Mesenchymal Stem Cell Response to Lactoferrin-based Composite Coatings / M. Icriverzi, A. Bonciu, L. Rusen, [et al.] // *Materials*. — 2019. — № 12. — P. 3414.
137. Hydroxyapatite nanorod and microsphere functionalized with bioactive lactoferrin as a new biomaterial for enhancement bone regeneration / P. Shi, Q. Wang, C. Yu, [et al.] // *Colloids and Surfaces B*. — 2017. — № 155. — P. 477–486.
138. Identification of a novel cathelicidin antimicrobial peptide from ducks and determination of its functional activity and antibacterial mechanism / W. Gao, L. Xing, P. Qu, [et al.] // *Scientific Reports*. — 2015. — № 5. — P. 17260.
139. Imaging the oral cavity: Key concepts for the radiologist / C. P. Law, R. Chandra, J. K. Hoang, [et al.] // *British Journal of Radiology*. — 2011. — № 84. — P. 944–957.
140. In vitro reproduction of endochondral ossification using a 3D mesenchymal stem cell construct / J. Sasaki, T. Matsumoto, H. Egusa, [et al.] // *Integrative Biology*. — 2012. — № 4 (10). — P. 1207–1214.
141. In Vivo Optical Coherence Tomography of the Human Oral Cavity and Oropharynx / J. M. Ridgway, W. B. Armstrong, S. Guo, [et al.] // *Archives of Otolaryngology. — Head Neck Surg*. — 2006. — № 132. — P. 1074–1081.
142. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration / P. Pelissier, A. C. Masquelet, R. Bareille, [et al.] // *Journal of Orthopaedic Research*. — 2004. — № 22 (1). — P. 73–79.
143. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: An ovine model / V. Viateau, G. Guillemin, Y. Calando., [et al.] // *Vet Surgery*. — 2006. — № 35 (5). — P. 445–452.
144. Inhibition of initial bacterial adhesion on titanium surfaces by lactoferrin coating / F. Nagano-Takebe, H. Miyakawa, F. Nakazawa, [et al.] // *Biointerphases*. — 2014. — № 9. — P. 29006.

145. Introduction to dental biomaterials and their advances / Z. Khurshid, M. S. Zafar, S. Najeeb, [et al.] // *Advanced Dental Biomaterials*. — Woodhead Publishing : Amsterdam, The Netherlands. — 2019. — P. 1–5.
146. Is keratinized mucosa indispensable to maintain peri-implant health? A systematic review of the literature / C. Brito, H. C. Tenenbaum, B. K. Wong, [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research*. — 2014. — № 102. — P. 643–650.
147. James, E. N. Development and characterization of lactoferrin loaded poly (epsilon-caprolactone) nanofibers / E. N. James, L. S. Nair // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. — 2014. — № 10. — P. 500–507.
148. Joo, H. S. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philos Trans* / H. S. Joo, C. I. Fu, M. Otto // *Royal Society B: Biological Sciences*. — 2016. — № 371. — P. 20150292.
149. Khandelwal, P. Management of Oro-antral Communication and Fistula: Various Surgical Options / P. Khandelwal, N. Hajira // *World Journal of Plastic Surgery*. — 2017. — № 6. — P. 3–8.
150. Kruzel, M. L. Lactoferrin in a Context of Inflammation-Induced Pathology / M. L. Kruzel, M. Zimecki, J. K. Actor // *Frontiers in Immunology*. — 2017. — № 8. — P. 1438.
151. Ku, J. K. Vestibuloplasty covering titanium mesh with grafted free gingiva on anterior mandible: technical report and rationale / J. K. Ku, D. H. Leem // *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. — 2019. — Vol. 45. — № 6. — P. 369–373.
152. Lactoferrin — A novel bone growth factor / D. Naot, A. Grey, I. R. Reid, [et al.] // *Clinical Medical Research*. — 2005. — № 3. — P. 93–101.
153. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview / I. A. García-Montoya, T. S. Cendón, S. Arévalo-Gallegos, [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2012. — № 1820. — P. 226–236.
154. Lactoferrin Adsorbed onto Biomimetic Hydroxyapatite Nanocrystals Controlling-In Vivo-the Helicobacter pylori Infection / A. Fulgione, N. Nocerino, M. Iannaccone, [et al.] // *PLoS ONE*. — 2016. — № 11. — P. 0158646.

155. Lactoferrin: An iron-binding antimicrobial protein against *Escherichia coli* infection / C. C. Yen, C. J. Shen, W. H. Hsu, [et al.] // *Biometals*. — 2011. — № 24. — P. 585–594.
156. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential / N. D. Embleton, J. E. Berrington, W. McGuire, [et al.] // *Semin in Fetal and Neonatal Medicine*. — WB Saunders : Philadelphia, PA, USA. — 2013. — Vol. 18. — P. 143–149.
157. Lactoferrin as a regenerative agent: The old-new panacea? / A. A. Antoshin, A. I. Shpichka, G. Huang, [et al.] // *Pharmacological Research*. — № 167. — 2021. — P. 105564.
158. Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties / F. Giansanti, G. Panella, L. Leboffe, [et al.] // *Pharmaceuticals*. — 2016. — № 9. — P. 61.
159. Lactoferrin-Hydroxyapatite Containing Spongy-Like Hydrogels for Bone Tissue Engineering / A. R. Bastos, L. P. da Silva, F. R. Maia, [et al.] // *Materials*. — 2019. — № 12. — P. 2074.
160. Lactoferrin-Immobilized Surfaces onto Functionalized PLA Assisted by the Gamma-Rays and Nitrogen Plasma to Create Materials with Multifunctional Properties / E. Stoleru, T. Zaharescu, G. E. Hitruc, [et al.] // *ACS Applied Materials and Interfaces*. — 2016. — № 8. — P. 31902–31915.
161. Lactoferrin in Bone Tissue Regeneration / M. Icriverzi, V. Dinca, M. Moisei, [et al.] // *Current Medicinal Chemistry*. — 2020. — № 27. — P. 838–853.
162. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo / J. Cornish, K. E. Callon, D. Naot, [et al.] // *Endocrinology*. — 2004. — № 145. — P. 4366–4374.
163. Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. Effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage-differentiated HL-60 cells / K. Miyazawa, C. Mantel, L. Lu, [et al.] // *Journal of Immunology*. — 1991. — № 146. — P. 723–729.
164. Lactoferrin: Major Physiological Functions and Applications / L. Hao, Q. Shan, J. Wei, [et al.] // *Current Protein and Peptide Science*. — 2019. — № 20. — P. 139–144.

165. Lantibiotic production is a burden for the producing staphylococci / P. Ebner, S. Reichert, A. Luqman, [et al.] // *Science Reports*. — 2018. — № 8. — P. 7471.
166. Le, Q. The application of human amniotic membrane in the surgical management of limbal stem cell deficiency / Q. Le, S. X. Deng // *The ocular surface*. — 2019. — № 17 (2). — P. 221–229.
167. Lin, G. H. The significance of keratinized mucosa on implant health: a systematic review / G. H. Lin, H. L. Chan, H. L. Wang // *Journal of Periodontology*. — 2013. — № 84. — P. 1755–1767.
168. Liu, J. Mechanisms of guided bone regeneration: A review / J. Liu, D. G. Kerns // *The Open Dentistry Journal*. — 2014. — № 8. — P. 56–65.
169. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12–14 years / R. E. Jung, N. Fenner, C. H. Hämmerle, [et al.] // *Clinical Oral Implants Research*. — 2013. — № 24. — P. 1065–1073.
170. Love, R. M. Biofilm–substrate interaction: from initial adhesion to complex interactions and biofilm maturity / R. M. Love // *Endodontic Topics*. — 2010. — Vol. 22. — № 1. — P. 50–57.
171. Madhav, N. S. Labial mucosa as novel transmucosal drug delivery platform[J] / N. S. Madhav, A. Ojha // *International Journal of Pharmaceutical Science*. — 2012. — № 4 (3). — P. 83–90.
172. Mechanically stable surface-hydrophobilized chitosan nanofibrous barrier membranes for guided bone regeneration / C. Wu, H. Su, A. Karydis, [et al.] // *Biomedical Materials*. — 2017. — № 13 (1). — P. 15004.
173. Meinig, R. P. Clinical use of resorbable polymeric membranes in the treatment of bone defects / R. P. Meinig // *Orthopedic Clinics of North America*. — 2010. — № 41 (1). — P. 39–47.
174. Melichercík, P. Antimicrobial Peptides for Topical Treatment of Osteomyelitis and Implant-Related Infections: Study in the Spongy Bone / P. Melichercík, O. Nešuta, V. Cerovský // *Pharmaceuticals*. — 2018. — № 11. — P. 20.

175. Mesenchymal stromal cells enhance vascularization and epithelialization within 7 days after gingival augmentation with collagen matrices in rabbits / A. Kulakov, E. Kogan, T. Brailovskaya, [et al.] // *Dentistry Journal*. — 2021. — № 9 (9). — P. 101.
176. Modifications of polymeric membranes used in guided tissue and bone regeneration / W. Florjanski, S. Orzeszek, A. Olchowy, [et al.] // *Polymers*. — 2019. — № 11 (5). — P. 782.
177. Mohamed, M. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus* / M. Mohamed, A. Abdelkhalek, M. Seleem // *Scientific Reports*. — 2016. — № 6. — P. 29707.
178. Montero, P. H. Cancer of the Oral Cavity / P. H. Montero, S. G. Patel // *Surgical Oncology Clinics of North America*. — 2015. — № 24. — P. 491–508.
179. Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin / L. Moreno-Expósito, R. Illescas-Montes, L. Melguizo-Rodríguez, [et al.] // *Life Sciences*. — 2018. — № 195. — P. 61–64.
180. Nanomaterials for periodontal tissue engineering: Chitosan-based scaffolds. A systematic review / D. Lauritano, L. Limongelli, G. Moreo, [et al.] // *Nanomaterials*. — 2020. — № 10 (4). — P. 605.
181. Naung, N. Y. Resorbable versus nonresorbable membranes: when and why? / N. Y. Naung, E. Shehata, J. E. Van Sickels // *Dental Clinics*. — 2019. — № 63 (3). — P. 419–431.
182. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease / S. Nyman, J. Lindhe, T. Karring, [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 1982. — № 9 (4). — P. 290–296.
183. On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration / J. Caballe-Serrano, A. Munar-Frau, O. Ortiz-Puigpelat, [et al.] // *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. — 2018. — № 10. — P. 477–483.
184. Onishi, H. Preparation and in vitro characteristics of lactoferrin-loaded chitosan microparticles / H. Onishi, Y. Machida, K. Koyama // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. — 2007. — № 33. — P. 641–647.

185. Oral diseases: A global public health challenge / M. A. Peres, L. M. Macpherson, R. J. Weyant, [et al.] // *Lancet*. — 2019. — № 394. — P. 249–260.
186. Oral Microbiota-Host Interaction Mediated by Taste Receptors / H. Dong, J. Liu, J. Zhu, [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. — 2022. — № 12. — P. 802504.
187. Oral pigmented lesions: Clinicopathologic features and review of the literature / R. Gondak, R. Da Silva-Jorge, J. Jorge, [et al.] // *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*. — 2012. — № 17. — P. 919–924.
188. Oral wound healing models and emerging regenerative therapies / A. I. Toma, J. M. Fuller, N. J. Willett, [et al.] // *Translational Research*. — 2021. — № 236. — P. 17–34.
189. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications / M. C. Catoira, L. Fusaro, D. Di Francesco, [et al.] // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. — 2019. — № 30 (10). — P.115.
190. Owen, R. In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders / R. Owen, G. C. Reill // *Frontiers in Bioengineering Biotechnology*. — 2018. — № 6. — P. 134.
191. Pall, E. Lactoferrin functionalized biomaterials: tools for prevention of implant-associated infections / E. Pall, A. Roman // *Antibiotics*. — 2020. — Vol. 9. — № 8. — P. 522.
192. Pfalzgraff, A. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds / A. Pfalzgraff, K. Brandenburg, G. Weindl // *Frontiers in Pharmacology*. — 2018. — № 9. — P. 281.
193. Preidl, R. H. M. Free gingival graft and collagen matrix revascularization in an enoral open wound situation / R. H. M. Preidl // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. — 2021. — Vol. 79. — № 5. — P. 1027–1037.
194. Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides / M. Yoshinari, T. Kato, K. Matsuzaka, [et al.] // *Biofouling*. — 2010. — № 26. — P. 103–110.

195. Progress in the development of chitosan-based biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine / B. Sultankulov, D. Berillo, K. Sultankulova, [et al.] // *Biomolecules*. — 2019. — № 9 (9). — P. 470.
196. Promoting oral mucosal wound healing with a hydrogel adhesive based on a phototriggered S-nitrosylation coupling reaction / W. Zhang, B. Bao, F. Jiang, [et al.] // *Advanced Materials*. — 2021. — № 33 (48). — P. 2105667.
197. Properties of a bovine collagen type I membrane for guided bone regeneration applications / I. S. Brum, C. N. Elias, J. J. de Carvalho, [et al.] // *e-Polymers*. — 2021. — № 21 (1). — P. 210–221.
198. Proteolysis Triggers Self-Assembly and Unmasks Innate Immune Function of a Human-Defensin Peptide / P. Chairatana, H. Chu, P. A. Castillo, [et al.] // *Chemical Science*. — 2016. — № 7. — P. 1738–1752.
199. Radiographic evaluation of modern oral implants with emphasis on crestal bone level and relevance to peri-implant health / H. De Bruyn, S. Vandeweghe, C. Ruyffelaert, [et al.] // *Periodontology*. — 2000–2013. — № 62 (1). — P. 256–270.
200. Randomized controlled clinical pilot study of all-ceramic single-tooth implant reconstructions: clinical and microbiological outcomes at one year of loading / F. D. Brandenburg, I. Sailer, V. Fehmer, [et al.] // *Clinical Oral Implants Research*. — 2017. — № 28. — P. 406–413.
201. Randomized controlled clinical study evaluating effectiveness and safety of a volume-stable collagen matrix compared to autogenous connective tissue grafts for soft tissue augmentation at implant sites / D. S. Thoma, M. Zeltner, M. Hilbe, [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2016. — № 43. — P. 874–885.
202. Recent advances in research applications of nanophase hydroxyapatite / K. Fox, P. A. Tran, N. Tran // *ChemPhysChem*. — 2012. — № 13. — P. 2495–2506.
203. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—A materials perspective / M. C. Bottino, V. Thomas, G. Schmidt, [et al.] // *Dental Materials*. — 2012. — № 28 (7). — P. 703–721.

204. Recent update on potential cytotoxicity, biocompatibility and preventive measures of biomaterials used in dentistry / R. A. Bapat, A. Parolia, T. Chaubal, [et al.] // *Biomaterials science*. — 2021. — № 9 (9). — P. 3244–3283.
205. Reinforced chitosan membranes by microspheres for guided bone regeneration / D. Huang, L. Niu, J. Li, [et al.] // *Journal of Mechanical Behavior Biomedical Materials*. — 2018. — № 81. — P. 195–201.
206. Retzepi, M. Guided bone regeneration: Biological principle and therapeutic applications / M. Retzepi, N. Donos // *Clinical Oral Implants Research*. — 2010. — № 21 (6). — P. 567–576.
207. Rocuzzo, M. Keratinized mucosa around implants in partially edentulous posterior mandible: 10-year results of a prospective comparative study / M. Rocuzzo, G. Grasso, P. Dalmaso // *Clinical Oral Implants Research*. — 2016. — № 27. — P. 491–496.
208. Selection of collagen membranes for bone regeneration: A literature review / L. Sbricoli, R. Guazzo, M. Annunziata, [et al.] // *Materials*. — 2020. — № 13 (3). — P. 786.
209. Sennerby, L. Implant stability measurements using resonance frequency analysis: biological and biomechanical aspects and clinical implications / L. Sennerby, N. Meredith // *Periodontology*. — 2000 ; 2008. — № 47 (1). — P. 51–66.
210. Soft tissue augmentation procedures at second-stage surgery: a systematic review / R. G. Bassetti, A. Stahli, M. A. Bassetti, [et al.] // *Clinical Oral Investigations*. — 2016. — № 20. — P. 1369–1387.
211. Squier, C. A. *Biology of Oral Mucosa and Esophagus* / C. A. Squier, M. J. Kremer // *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. — 2001. — № 2001 (29). — P. 7–15.
212. State of the Art on Biomaterials for Soft Tissue Augmentation in the Oral Cavity. Part I: Natural Polymers-Based Biomaterials / M. Toledano, M. Toledano-Osorio, Á. Carrasco-Carmona, [et al.] // *Polymers*. — 2020. — № 12. — P. 1850.

213. Szabo, L. Strategies to functionalize the anionic biopolymer Na-alginate without restricting its polyelectrolyte properties / L. Szabo, S. Gerber-Lemaire, C. Wandrey // *Polymers*. — 2020. — № 12 (4). — P. 919.
214. Takayama, Y. Effect of lactoferrin-embedded collagen membrane on osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells / Y. Takayama, K. Mizumachi // *Journal of bioscience and bioengineering*. — 2009. — Vol. 107. — №. 2. — P. 191–195.
215. Techniques, tricks, and stratagems of oral cavity computed tomography and magnetic resonance imaging / D. Maraghelli, M. Pietragalla, L. Calistri, [et al.] // *Applied Sciences*. — 2022. — № 12 (3). — P. 1473.
216. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications / J. Lei, L. Sun, S. Huang, [et al.] // *American Journal of Translational Research*. — 2019. — № 11. — P. 3919–3931.
217. The condensation of collagen leads to an extended standing time and a decreased pro-inflammatory tissue response to a newly developed pericardiumbased barrier membrane for guided bone regeneration / T. Gueldenpfennig, A. Houshmand, S. Najman, [et al.] // *In Vivo*. — 2020. — № 34 (3). — P. 985–1000.
218. The influence of peri-implant keratinized mucosa on brushing discomfort and peri-implant tissue health / A. B. Souza, M. Tormena, F. Matarazzo, [et al.] // *Clinical Oral Implants Research*. — 2016. — № 27. — P. 650–655.
219. The Potential of Class II Bacteriocins to Modify Gut Microbiota to Improve Host Health / Ö. C. Umu, C. Bäuerl, M. Oostindjer, [et al.] // *PLoS ONE*. — 2016. — № 11. — P. 0164036.
220. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): A patent review / H. K. Kang, C. Kim, C. H. Seo, [et al.] // *Journal of Microbiology*. — 2017. — № 5. — P. 1–12.
221. The use of mucograft collagen matrix to augment the zone of keratinized tissue around teeth: a pilot study / M. Nevins, M. L. Nevins, S. W. Kim, [et al.] // *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. — 2011. — № 31 (4).

222. The use of Poly-d,l-lactic acid (PDLLA) devices for bone augmentation techniques: A systematic review / M. Annunziata, L. Nastro, G. Cecoro, [et al.] // *Molecules*. — 2017. — № 22 (12). — P. 2214.
223. Thoma, D. S. Management and prevention of soft tissue complications in implant dentistry / D. S. Thoma // *Periodontology 2000*. — 2022. — Vol. 88. — № 1. — P. 116–129.
224. Tri-layered functionally graded membrane for potential application in periodontal regeneration / A. T. Shah, S. Zahid, F. Ikram, [et al.] // *Materials Science and Engineering C-Materials of Biological Applications*. — 2019. — № 103. — P. 109812.
225. Vertical ridge augmentation around dental implants with the use of a dense PTFE membrane to correct previously failed augmentations / N. Soldatos, M. Garcia, E. Umoh, [et al.] // *Clinical Advances in Periodontics*. — 2022. — № 12 (1). — P. 51–56.
226. Vivosorb as a barrier membrane in rat mandibular defects. An evaluation with transversal microradiography / E. J. Hoogveen, P. F. Gielkens, J. Schortinghuis, [et al.] // *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. — 2009. — № 38 (8). — P. 870–875.
227. Wessing, B. Guided bone regeneration with collagen membranes and particulate graft materials: A systematic review and metaanalysis / B. Wessing, S. Lettner, W. Zechner // *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. — 2018. — № 33 (1). — P. 87–100.
228. Wound healing dynamics, morbidity, and complications of palatal soft-tissue harvesting / L. Tavelli, S. Barootchi, M. Stefanini, [et al.] // *Periodontology 2000*. — 2023. — № 92 (1). — P. 90–119.
229. Zanetti, M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals / M. Zanetti // *Current Issues in Molecular Biology*. — 2005. — № 7. — P. 179–196.
230. Zigdon, H. The dimensions of keratinized mucosa around implants affect clinical and immunological parameters / H. Zigdon, E. E. Machtei // *Clinical Oral Implants Research*. — 2008. — № 19. — P. 387–392.

231. Zucchelli's technique or tunnel technique with subepithelial connective tissue graft for treatment of multiple gingival recessions / C. Bherwani, A. Kulloli, R. Kathariya, [et al.] // Journal of the International Academy of Periodontology. — 2014. — № 16 (2). — P. 34–42.