

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



Бороздкин Леонид Леонидович

**Разработка и применение модифицированной биорезорбируемой мембраны
на полимерной основе, обработанной гидрозолю наночастиц серебра**

3.1.7. Стоматология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

профессор, член-корреспондент РАН

Иванов Сергей Юрьевич

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 13 |
| 1.1. Современный взгляд на решение проблемы устранения дефектов зубных рядов | 13 |
| 1.2. Особенности регенерации костной ткани при направленном стимуляционном воздействии | 16 |
| 1.3. Остеопластические материалы, применяемые для регенерации дефектов костной ткани в хирургической стоматологии | 18 |
| 1.3.1. Свойства и эффективность применения остеопластических материалов при дентальной имплантации | 18 |
| 1.3.2. Направленная костная регенерация с применением мембран | 23 |
| 1.3.3. Лекарственные средства на основе наночастиц серебра | 32 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 38 |
| 2.1. Общая структура экспериментального исследования..... | 38 |
| 2.2. Материалы и методы..... | 39 |
| 2.2.1. Методика получения мембраны на основе полилактида | 39 |
| 2.2.2. Методики измерения физических свойств мембраны..... | 42 |
| 2.2.3. Методики получения гидрозоля наночастиц серебра (Ag)..... | 42 |
| 2.2.4. Характеристика и свойства мембраны сравнения («Биопласт-Дент»)..... | 43 |
| 2.2.5. Методика исследования деградации мембраны | 44 |
| 2.3. Методики экспериментальных исследований мембран в условиях <i>in vitro</i> | 45 |
| 2.3.1. Исследование токсичности гидрозоля наночастиц серебра на биотест-объекте <i>Daphnia magna</i> Straus..... | 45 |
| 2.3.2. Исследование цитотоксичности мембран | 46 |
| 2.3.2.1. Исследование цитотоксичности мембран на культурах клеток нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов | 46 |
| 2.3.2.2. Исследование индекса выживаемости лейкоцитов | 47 |
| 2.3.2.3. Исследование антимикробной активности мембран..... | 48 |

| | |
|---|----|
| 2.3.2.4. Исследование цитокондуктивности и биосовместимости мембран..... | 50 |
| 2.4. Экспериментальные исследования мембран на моделях <i>in vivo</i> | 51 |
| 2.4.1. Набор животных и дизайн исследования | 51 |
| 2.4.2. Методики оперативного вмешательства..... | 53 |
| 2.4.3. Исследование токсичности <i>in vivo</i> | 54 |
| 2.4.4. Исследование регенерации костной ткани на критическом дефекте свода черепа кролика породы Шиншилла | 55 |
| 2.5. Лабораторные методы исследования | 56 |
| 2.6. Методы статистического анализа полученных результатов | 58 |
| ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ | |
| БИОРЕЗОРБИРУЕМОЙ МЕМБРАНЫ НА ПОЛИМЕРНОЙ ОСНОВЕ, | |
| СОДЕРЖАЩЕЙ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА | |
| 3.1. Получение раствора гидрозоля со стабилизированными наночастицами серебра..... | 59 |
| 3.2. Исследование токсичности гидрозоля наночастиц серебра | 62 |
| 3.3. Методика нанесения наночастиц серебра на полимерную мембрану..... | 63 |
| 3.3.1. Разработка методики нанесения наночастиц серебра на полимерную мембрану | 63 |
| 3.3.2. Исследование скорости деградации мембран в физиологическом растворе | 69 |
| ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ | |
| БИОСОВМЕСТИМОСТИ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕМБРАН | |
| С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА..... | |
| 4.1. Исследование токсичности и биосовместимости <i>in vitro</i> | 71 |
| 4.1.1. Исследование цитотоксичности мембран на культурах клеток нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов..... | 71 |
| 4.1.2. Исследование индекса выживаемости лейкоцитов крови человека..... | 72 |
| 4.1.3. Исследование антимикробной активности мембран <i>in vitro</i> | 74 |
| 4.1.4. Исследование цитокондуктивности и биосовместимости мембран..... | 77 |
| 4.1.5. Исследование токсичности и биосовместимости на самках белых крыс | 83 |

| | |
|--|-----|
| ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОРЕЗОРБИРУЕМОЙ МЕМБРАНЫ НА ПОЛИМЕРНОЙ ОСНОВЕ С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОСТНОЙ ТКАНИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ | 87 |
| 5.1. Исследование регенерации костной ткани на критическом дефекте свода черепи кролика породы Шиншилла | 87 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 95 |
| ВЫВОДЫ | 104 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | 105 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 106 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 107 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

«К настоящему времени в стоматологической практике накоплен значительный клинический опыт по устранению дефектов зубных рядов с помощью дентальных имплантатов» [27; 42; 43]. «Мостовидные конструкции с опорой на дентальные имплантаты существенно повышают качество жизни пациентов, обеспечивая значительный комфорт и функциональность» [45; 224; 225; 253]. «Вместе с тем, при дефектах зубных рядов большой протяженности и выраженной атрофией костной ткани, связанной с потерей зубов, осуществление дентальной имплантации затруднено» [22; 61; 201; 208; 223].

«Преодолеть существенные ограничения дентальной имплантации в условиях атрофии костной ткани позволяют хирургические методы, направленные на увеличение ее объема в виде аутокостной трансплантации, межкортикальной остеотомии и направленной костной регенерации с помощью изолирующих мембран» [39; 80]. «Данные мембраны выполняют защитную функцию для предотвращения резорбции трансплантатов» [169; 175; 211; 215; 226]. Основными требованиями к материалам мембран являются: «высокая биосовместимость, синхронность резорбирования с формированием новообразованной костной ткани» [25; 26; 69; 70; 87; 125; 128; 161; 179]. «К таким материалам могут быть отнесены биорезорбируемые полимеры на основе полимолочной кислоты» [244], которые в настоящее время широко используются для создания мембран используемые для регенерации костной ткани челюстей.

С другой стороны, в стоматологической практике в большинстве случаев пересадка костнопластических материалов осуществляется в условиях длительно существующего воспалительного процесса, что нередко отрицательно сказывается на результате лечения. Применение антибиотиков в высоких дозах, оказывается, в данной ситуации далеко не всегда эффективно, и связано со значительной лекарственной нагрузкой на организм. В связи с этим, необходима разработка

методов целенаправленного антимикробного воздействия непосредственно в области операционной раны. «Известно, что серебро характеризуется выраженными бактерицидными, противовирусными, противогрибковыми и антисептическими свойствами и считается наиболее эффективным обеззараживающим средством в борьбе с патогенными микроорганизмами» [104]. «Уникальные антимикробные и противовирусные качества соединений серебра основаны на медленном окислении с высвобождением в окружающую среду ионов Ag^+ » [50; 60; 105; 119]. «Использование наночастиц серебра (НЧ Ag) в стоматологической практике показало их высокую активность в отношении микроорганизмов» [100; 109].

На сегодняшний день в челюстно-лицевой хирургии не существует изолирующих мембран для направленной костной регенерации, обладающих антибактериальным действием. В связи с этим, актуальными являются «исследования связанные с перспективами использования коллоидных растворов наночастиц серебра в качестве антибактериального компонента в составе мембран для направленной костной регенерации» [170].

Степень разработанности темы исследования

Проблемам дефектов альвеолярной кости и адентии посвящены труды отечественных ученых: Бажанова Н.Н., Бизяева А.Ф., Евдокимова А.И., Иванова С.Ю., Базикяна Э.А., Кулакова А.А., Волкова А.В. и многих других. В последние годы данной проблеме уделяется также огромное внимание, поскольку «поражения костных тканей занимают одно из первых мест среди причин временной нетрудоспособности и развития инвалидности» [44]. На данный момент в значительном количестве публикаций как российских, так и зарубежных авторов, описано множество методик и материалов для восстановления альвеолярной части и гребня челюстей. Но в современной медицине еще нет остеопластических материалов, используемых для аугментации костной ткани и обладающих антибактериальным эффектом.

Цель исследования

Разработка изолирующей мембраны на полимерной основе с противовоспалительными свойствами за счет обработки гидрозоля наночастиц серебра для повышения эффективности устранения костных дефектов методом направленной костной регенерации.

Задачи исследования

1. Разработка методики нанесения гидрозоля наночастиц Ag на полимерную мембрану для направленной костной регенерации тканей, обеспечивающей действенный противомикробный эффект в месте имплантации.
2. Исследование динамики биодеградации мембраны с нанесённым на неё наночастицами Ag.
3. Изучение антимикробного эффекта.
4. Исследование эффективности применения разработанной мембраны для замещения дефектов костных тканей в эксперименте на животных.

Научная новизна исследования

Разработана методика нанесения наночастиц Ag на биорезорбируемую барьерную мембрану из полилактида, обеспечивающую ей бактерицидный и бактериостатический эффект.

Впервые определена оптимальная концентрация гидрозоля наночастиц серебра (0,2 мг/мл), не оказывающая токсический эффект, для изготовления мембраны из полилактида с антибактериальными свойствами, используемой в направленной регенерации костных тканей.

Доказана биосовместимость, цитокондуктивность на культурах клеток *in vitro* и на животных моделях *in vivo*. Отсутствие токсического эффекта мембраны PLA-Ag и ее компонентов доказана в тесте на выживаемость рачков *Daphnia magna*

Straus; на культуре клеток нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов, по результатам биохимических и гематологических показателей сыворотки периферической крови белых крыс после подкожной имплантации мембраны.

Антибактериальная активность мембраны подтверждена в отношении клинических штаммов *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекционными осложнениями после установки стоматологических имплантатов. Установлено снижение выраженности воспалительной реакции в области операционной раны, что создает условия для оптимального развития регенеративного процесса, что наиболее важно на ранних стадиях, когда наиболее вероятно развитие осложнений; это подтверждают биоактивные и биосовместимые свойства разработанной мембраны.

Доказано, что при применении остеопластической мембраны из полилактида с нанесенными на нее наночастицами Ag в технике направленной костной регенерации процесс остеогенеза протекает более интенсивно. Проведенные исследования подтвердили целесообразность использования мембраны PLA-FAg при костнопластических операциях в силу выраженного антимикробного и противовоспалительного действия, способствующих быстрому затуханию воспалительного процесса в очаге повреждения и, как следствие, ускорению последующей активации процессов регенерации костной ткани.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработана новая методика нанесения наночастиц Ag на остеопластическую мембрану, основанная на погружении мембраны в раствор гидрозоля «НанАргол» с концентрацией наночастиц Ag 0,2 мг/мл непосредственно перед практическим использованием. Капиллярное впитывание и адсорбция наночастиц серебра в пористую волокнистую структуру мембраны при контакте с поврежденными тканями позволяет формировать объемную антимикробную зону, препятствующую появлению и развитию нежелательной микрофлоры и

одновременно способствующую повышению приживаемости трансплантата, установленного на места костных дефектов при использовании метода направленной костной регенерации.

Данная методика проста в исполнении, не требует никаких дополнительных инструментальных или временных затрат и может выполняться непосредственно во время или перед оперативным вмешательством.

Методология и методы исследования

«Заключается в системном и комплексном анализе научных трудов отечественных и зарубежных ученых в области механизмов репаративного остеогенеза, регенерации, пролиферации клеток соединительной ткани, клеточном взаимодействии, которые сформировали основные положения учения о регенерации костной ткани млекопитающих, влиянии остеопластических материалов на репаративные процессы в костной ткани» [170].

«В работе использованы следующие методы: гистологические (специфические методы окраски костной ткани, специальные методы подготовки костных шлифов и приготовление гистологических препаратов); морфометрические методы, методы флуоресцентной микроскопии» [145].

Основные положения, выносимые на защиту

1. Остеопластическая мембрана из «полилактид-фиброина» с наночастицами Ag нетоксична, биосовместима с органами и тканями, характеризуется антибактериальными цито- и остеокондуктивными свойствами.
2. Применение остеопластической мембраны из «полилактид-фиброина» в комбинации с наночастицами Ag в технике направленной тканевой регенерации, способствует активации остеогенеза и повышению приживаемости имплантата, установленного на места костных повреждений.

3. Наночастицы Ag оказывают непосредственное влияние на рост клеток соединительной ткани и активацию регенераторного процесса при костнопластических операциях в силу выраженного антимикробного и противовоспалительного действия, способствуя быстрому затуханию воспалительного процесса в очаге повреждения и, как следствие, ускорению последующей активации процессов регенерации костной ткани.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования, их решением, использованием современных апробированных методов исследования, корректностью применения, достаточным объемом данных для каждой исследовательской группы, достаточным количеством групп сравнения в экспериментах, адекватным применением методов статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы.

Результаты исследования докладывались и обсуждались на конференциях: X научно-практической конференции молодых ученых «Научные достижения современной стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» (Москва, 2019 г., ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Минздрава России); юбилейной научно-практической конференции стоматологов и челюстно-лицевых хирургов, посвященной 120-летию стоматологического образования в Российской Федерации «Стоматологическое образование и наука XXI века» (Санкт-Петербург, 2019 г.); научно-практической конференции челюстно-лицевых хирургов и стоматологов, посвященной 100-летию со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Владимира Федоровича Рудько, «Актуальные вопросы хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» (Москва, 2019 г.).

Апробация диссертационной работы проведена на заседании кафедры челюстно-лицевой хирургии имени академика Н.Н. Бажанова Института стоматологии имени Е.В. Боровского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М.

Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (г. Москва, 16.09.2022 г., протокол № 1).

Внедрение результатов исследования

Основные результаты работы включены в учебную программу кафедры челюстно-лицевой хирургии имени академика Н.Н. Бажанова Института стоматологии имени Е.В. Боровского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Получено одобрение этического комитета на дальнейшее исследование разработанной остеопластической мембраны с нанесенными на нее наночастицами серебра в клинической практике.

Данная методика внедрена в клиническую практику отделения Дневного стоматологического стационара Стоматологического Центра ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и отделения челюстно-лицевой хирургии Университетской клинической больницы №4 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

Автор лично занимался проведением экспериментального исследования остеопластического материала из полилактида с наночастицами Ag и принял участие в оценке экспериментальных данных. Прооперировано 33 животных (9 белых крыс; 24 кролика породы Шиншилла), получены и изучены гистологические и иммуногистохимические препараты.

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 5 научных работ, в том числе 2 статьи в научно-практических 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; 3 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют пункту 4 «Разработка и совершенствование методов дентальной имплантации» и пункту 9 «Разработка и совершенствование стоматологических материалов, инструментов и оборудования» паспорта научной специальности 3.1.7. Стоматология.

Объем и структура диссертации

Содержание диссертации: введение, обзор литературы, 5 глав, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы. Работа изложена на 139 страницах, содержит 10 таблиц, 28 рисунков, список литературы из 279 источников, в том числе 120 отечественных и 159 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современный взгляд на решение проблемы устранения дефектов зубных рядов

«По данным отечественных и зарубежных источников численность населения, нуждающегося в стоматологической помощи по поводу полного отсутствия зубов, из года в год увеличивается и к 2020 году достигнет 15 млн человек» [5]. «Данные об утрате зубов в различных странах колеблются от 20% до 70% и крайне противоречивы. В среднем 18,4% лиц старше 44 лет лишаются зубов полностью. При этом показатели для сельских районов достигают 52%» [47]. «В ортопедическом лечении нуждаются 350–650 человек из 1000» [37].

В США ежегодно устанавливается более 5 млн зубных имплантатов и это число продолжает неуклонно увеличиваться. В течение ближайших лет предполагаемый ежегодный прирост составит 12-15 %. Для сравнения: «в 2010 г. было продано продукции, используемой при имплантации, на сумму более 1 млрд. долларов, в 2005 – на 550 млн долларов, в 1983 – на 10 млн долларов» [170].

«Полная потеря зубов сопровождается не только существенными функциональными нарушениями жевательного аппарата, затрудненным носовым дыханием и речеобразованием, но и изменением антропологических параметров. Перестройка зубочелюстной системы выражается в изменении строения челюстных костей, височно-нижнечелюстных суставов, мышечного аппарата челюстно-лицевой области, слизистой оболочки полости рта» [40; 99]. «Вид анатомо-физиологической и функциональной перестройки напрямую связан с причиной и давностью утери зубов, возрастом, перенесёнными заболеваниями и другими факторами. К тому же при потере зубов, как правило, затруднен процесс социальной адаптации» [46].

«Дефекты зубных рядов, в том числе полное отсутствие зубов, зачастую осложняют полноценную и эффективную фиксацию протезов. Одним из способов решения проблемы является установка дентальных имплантатов» [27; 30; 42; 43].

В XI веке испанским врачом Алабукасимом была разработана методика трансплантации аллогенных зубов, получившая в дальнейшем широкое распространение. Она со временем заменила установку зубных имплантатов из золота и слоновой кости, а к XVIII столетию начала использоваться повсеместно. Вместе с тем из-за частой передачи с аллогенным трансплантатом контагиозных и часто неизлечимых болезней (туберкулёз, сифилис и др.) в XIX веке данная методика была запрещена. Последующее развитие дентальной имплантации было связано с поиском материалов небиологического происхождения с целью изготовления имплантатов, а также способов увеличения объёма альвеолярного отростка. «Одновременно в хирургическую практику вошли понятия об асептике и антисептике, позволившие уменьшить процент воспалительных осложнений, что явилось дополнительным импульсом в развитии имплантологии» [83].

«В начале XX века в качестве материалов для изготовления имплантатов использовали в основном металлы (золото, алюминий, серебро, бронза, медь, магний) или мягкие типы стали, покрытые золотом и никелем. В 1938 г. А. Strode описаны результаты установления в лунку верхнего левого резца винтообразного имплантата из «виталлиума» – хирургического сплава кобальта, хрома и меди. Данный имплантат был установлен сразу после удаления и функционировал в течение 15 лет. В 1946 году А. Strock сконструировал двухэтапный (погружной) имплантат. Его внутрикостную часть устанавливали под слизистой оболочкой, а внекостную часть (супраструктуру) присоединяли к первой части после полного заживления хирургической раны. Гистологически на границе между имплантатом и костью наблюдается анкилоз что клинически проявлялось в виде неподвижной фиксации» [5].

«Открытие остеоинтеграции и формирование на этой основе нового направления применения внутрикостных имплантатов с целью лечения пациентов с частичной или полной потерей зубов явилось одним из самых значимых достижений практической стоматологии второй половины XX века и предпривших сегодняшний уровень развития дентальной имплантологии» [5].

Однако, до настоящего времени, возможности ее клинического применения, существенно ограничиваются вследствие атрофических изменений альвеолярных отростков (частей) челюстей.

«По утверждениям многих авторов потребность в проведении реконструкции альвеолярных отростков (частей), горизонтальных и вертикальных дефектов в области атрофии, перед установкой зубных имплантатов отмечается у 60–90% пациентов» [45; 224; 225; 253]. «Несмотря на успешное развитие дентальной имплантологии, атрофия альвеолярного отдела челюстей при утрате зубов сопряжена с существенными трудностями в процессе изготовления и фиксации зубных протезов с опорой на имплантаты» [19]. «При установке дентальных имплантатов критичными является атрофия альвеолярной части нижней челюсти, в которой проходит нижнечелюстной канал с мощным нервным стволом и магистральным сосудом, и альвеолярного отростка верхней челюсти в проекции верхнечелюстного синуса» [22; 61; 148; 201; 208].

При реабилитации пациентов с частичным или полным отсутствием зубов наряду с необходимостью увеличения высоты альвеолярного отростка приходится принимать во внимание и функциональные нарушения жевательных мышц. «Как правило, данные нарушения проявляются в виде уменьшения активности биоэлектрической мышц, нарушением ритма жевания, увеличением продолжительности пережевывания и числа жевательных движений, формируя полный диссонанс жевательной системы» [68; 85]. «Поэтому достижение у таких пациентов необходимых эстетических и функциональных требований, является серьезной клинической проблемой» [147; 157; 228; 247].

«При раннем множественном удалении зубов, а также возрастной атрофии костной ткани челюсти с течением времени утрачивается её объем, что обуславливает необходимость разработки и применения оптимальных материалов для дентальной имплантологии» [29; 102; 111].

«На сегодняшний день дефекты альвеолярной кости в области корней зубов и в периимплантатной зоне, образующиеся вследствие воспалительных процессов, заменяют аллогенными, аутогенными или синтетическими материалами с целью

наращивания объема альвеолярной кости и восстановления ее анатомической формы» [39; 80]. Количество этих материалов постоянно увеличивается, однако их применение в реальной клинической практике не всегда может обеспечить гарантированный результат.

1.2. Особенности регенерации костной ткани при направленном стимуляционном воздействии

«Регенерация ткани представляет собой процесс восстановления поврежденных тканей в определенный период времени» [66; 67; 227]. Основные механизмы регенерации костной ткани уже достаточно хорошо изучены. «Установлены факторы, влияющие на эффективность регенерации: васкуляризация зоны повреждения, подвижность костных отломков, присутствие инородных тел и т.д.» [18; 192; 230].

«Однако несмотря на профилактические и лечебные мероприятия, костная ткань не всегда способна восстановиться в полном объеме» [82]. «Повреждение ткани, в результате которого невозможна самостоятельная регенерация, называется критическим повреждением или критическим дефектом» [82]. В этом случае требуется воздействие стимулирующих факторов, в качестве которых используются костнопластические материалы.

«Независимо от фактора повреждения различают каскад последовательных этапов с большой или меньшей подробностью его изложения» [49; 117]. Непосредственно после повреждения кровь, выделившаяся в костную рану, сворачивается в сгусток. «В зоне погибших тканей выделяются цитокины и факторы роста, стимулирующие клеточную миграцию полиморфно-ядерных нейтрофилов, макрофагов и стволовых клеток в область дефекта» [98]. Макрофаги и другие клетки крови проводят очищение раны от нежизнеспособных тканей. «Мезенхимальные стволовые клетки (в том числе клеточные популяции эндоста, периоста, перициты сосудов) дифференцируются в остеопрогениторные клетки (преостеобласты, прехондробласты)» [231].

«В зависимости от условий течения и расположения повреждения, процесс регенерации проходит по пути прямого или эндотрахеального остеогенеза. Прямой остеогенез характерен для лицевого скелета и протекает следующим образом. В области надкостницы и эндоста наблюдается синхронное разрастание эндотелия сосудов с образованием капилляров, стромальных клеточных элементов фибробластического ряда, образование первичных островков костной ткани как на поверхности поврежденной кости, так и в остеогенном слое надкостницы. Костные островки, увеличиваясь в размерах объединяются и образуют сеть (ретикулофиброзная костная ткань), которая в дальнейшем нарастает, созревает, минерализуется и превращается в костные трабекулы» [145]. «Первичная трабекулярная сеть далее претерпевает изменения, свойственные для компактной или губчатой костной ткани» [191]. Однако, чем «больше костная рана и хуже условия для адекватного кровоснабжения, тем меньшее количество кровеносных сосудов проникает из стенок дефекта в регенерат и, как следствие, низкое парциальное давление кислорода в глубоких слоях регенерата, что приводит к дифференцировке остеопрогениторных клеток (преостеобластов) в хондробласты и к образованию островков хрящевой или хрящеподобной (хондроид) ткани» [250; 265].

При остеогенезе «активное участие принимают основные компоненты межклеточного вещества: коллаген, протеогликаны, гликопротеиды и факторы роста» [157; 200]. В процессе регенерации основная роль отводится ангиогенезу, в связи с тем, что сосудистой сетью переносятся кислород, питательные вещества, растворимые факторы и многочисленные типы клеток. «Капиллярный эндотелий играет основную роль в поддержании гомеостаза кости» [194; 212; 213; 214]. Кроме того, «сосудистая система для окружающих тканей поставляет такие соединения, как факторы роста гормоны, цитокины, хемокины и метаболиты и действует как барьер, ограничивающий движение молекул и клеток» [82; 157; 160; 194].

«Основы оптимизации регенерации кости заключаются в индукции и кондукции за счет внесения остеопрогениторных клеточных элементов (стимуляция путем замещения). Каждая потенция может рассматриваться

самостоятельно или в комплексе для стимуляции репаративного остеогенеза» [42; 245; 255; 263].

«Стимуляция регенерации с использованием специальных биосовместимых материалов различного химического состава и происхождения основана на явлении остеокондукции – способности в стимуляции остеогенеза посредством активации местных (собственных) факторов роста в зоне дефекта, то есть способствованию преобразования клеток организма в зоне регенерации именно в костную ткань, остеокондукции – тип остеогенеза, при котором костнопластический материал выступает в роли пассивной матрицы для аппозиционного роста костной ткани» [17; 121; 133; 142; 167; 257].

«Направленная костная регенерация предусматривает совокупность методов, нацеленных на обеспечение условий восстановления костной ткани за счет введения в область костного дефекта остеокондуктивного материала или установление ограничения зоны костной регенерации от мягких тканей» [169; 175; 211; 215; 226; 242; 279].

1.3. Остеопластические материалы, применяемые для регенерации дефектов костной ткани в хирургической стоматологии

1.3.1. Свойства и эффективность применения остеопластических материалов при дентальной имплантации

«Для лечения атрофии альвеолярного отдела челюстей с целью последующей или одномоментной дентальной имплантации успешно применяются аутотрансплантаты и костнопластические материалы различного происхождения: алло-, ксено- и синтетические аналоги минерального и органического компонентов кости» [2; 31]. «Вместе с тем разнообразный ассортимент природных и синтетических материалов, а также собственных тканей не позволяет найти материал, отвечающий всем необходимым требованиям» [45; 107; 218; 252].

Современные природные и синтетические остеопластические материалы, обладая хорошими остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами, различаются по скорости резорбции. «Это может приводить как к длительному пребыванию гранул в месте имплантации» [9; 10; 25; 41], так и слишком быстрому их рассасыванию, прежде чем область дефекта полностью заполнится жизнеспособным регенератом. «Эффективность остеопластических материалов напрямую связана с их биологическими свойствами, оказывающими влияние на поддержание воспаления, остеокондукцию, остеоиндукцию» [25; 26; 87]. «Безопасность материала, устанавливаемого в костную рану, базируется, в первую очередь, на его взаимодействии с воспринимающим ложем и макроорганизмом в целом» [32; 33; 34; 72].

«Таким образом, остеопластические материалы должны гарантировать относительную простоту хирургического вмешательства, широкие возможности моделирования, стабильность химической структуры, устойчивость к инфекции и т.д.» [150; 154; 159]. «К тому же, современный «идеальный» костнозамещающий материал должен обладать остеогенностью; остеоиндукцией; остеокондукцией; остеопротекцией» [26; 46; 89; 91].

«В практике хирургической стоматологии в процессе ряда операций (цистэктомии, удалении ретенированных и дистопированных зубов и др.) образуются дефекты кости, для устранения которых необходимо наличие полноценной костной ткани» [39]. «Неминуемое нарушение целостности кости в зоне хирургического вмешательства зачастую связано с продолжительным заживлением, итогом которого является неполное или плохое восстановление костной ткани» [34; 72]. «Неполное прорезывание сформированного зуба через компактную пластинку обычно сопряжено с воспалением. Ретенированный зуб также может служить источником воспаления, невралгии, неврита» [39].

«Одной из наиболее распространенных причин утраты альвеолярной кости в процессе ее резорбции является травматическое удаление зубов. С целью предотвращения утраты костной ткани изучались различные способы и возможности ее сохранения, в том числе в процессе одномоментной дентальной

имплантации» [38; 96; 209; 274]. «Так, Yukna R. и соавт. (2003) предлагалось одновременно с имплантатом, покрытым гидроксиапатитом, вносить в лунку полиметилметакрилат, полигидроксилэтилметакрилат и гидроксид кальция. В результате по истечении 6 месяцев в 60% случаев ширина альвеолярного отдела сохранялась» [274].

«Использование мембранной техники для этих целей показало большую результативность» [236; 259]. «Одномоментная установка имплантата после удаления зуба способствовала минимальной резорбции альвеолярного гребня. Коэффициент приживаемости имплантатов при установке в лунку удаленного зуба и в созревшую кость отличались незначительно» [153].

Для замены костной ткани при заполнении постэкстракционных альвеол Ашманом А. и Лопинто И. (2002) применен искусственный полимерный имплантат «Bioplant-HTR». «Перед его установлением проводили декортикацию кортикального слоя кости, гидратировали ее кровью» [6].

«Для профилактики атрофии кости альвеолярного гребня и сокращения длительности дентальной имплантации Самсоновым В.Е. и соавторами (1996) был применен деминерализованный костный матрикс» [101]. «Композиционный материал на основе губчатых костей 16-26-ти недельных эмбрионов характеризовался хорошими гемокоагуляционными и антиагрегатными свойствами. Вместе с тем концентрация РНК в деминерализованном костном матриксе была значительно выше, чем в кости взрослого донора, что гарантировало успех применения данного материала при восстановлении дефекта кортикальной кости» [101; 139; 268].

«Трезубов В.Н. и соавт. (1998) с целью уменьшения степени постэкстракционной атрофии альвеолярного отдела нижней челюсти использовал формализированный деминерализированный брфоостеоматрикс. Экспериментально были доказаны его высокие остеостимулирующие свойства, выражающиеся, в снижении в 1,8 раз степени постэкстракционной атрофии альвеолярной кости» [108].

«Володиной Д.Н. (2008) в экспериментах на животных при операциях синус-лифтинг и удалении 3-го моляра установлены стимулирующие костнопластические свойства остеопластического материала «Остеопласт-К», разработанного на основе костного недеминерализованного коллагена и насыщенного сульфатированными гликозаминогликанами. Эффективность материала определялась содержанием в нем гликозаминогликанов, являющихся факторами роста костной ткани. При этом репаративное восстановление позволило получить «необходимый» и «достаточный» объем костной ткани» [20].

Robiony M. и соавторами (2002) был разработан новый distractionный метод для дентальной имплантации со значительной атрофией нижней челюсти при полном отсутствии зубов (класс V и VI). Авторами предлагалось заполнение distractionного пространства для получения регенерата производить смесью аутологичной кости (из гребня подвздошной кости) и концентрата аутологичных тромбоцитов (из плазмы). Скорость distraction составляла 0,5 мм/день. К 60-м суткам distractionный аппарат устраняли и устанавливали имплантаты. Разработанный метод показал хорошие результаты по регенерации кости сильно атрофированной нижней челюсти. При этом, «distractionный остеогенез позволил увеличить только высоту альвеолярного гребня» [220].

«Рядом авторов также рекомендованы методики применения аутотрансплантатов для увеличения объема альвеолярного отдела челюстной кости» [126]. Так, Nocini P.F. с соавт. (2002) «было предложено использование трансплантата из малоберцовой кости на микрососудистой ножке» [198]. Bschorer R. и Schmelzle R. (1997) «удалось повысить на 16 мм размер альвеолярного гребня с помощью трансплантата из малоберцовой кости» [129]. «Для формирования «идеального» контура кости в альвеолярном отделе челюсти перед установкой имплантата наращивание альвеолярного гребня проводили с помощью аутотрансплантатов из кортикального слоя» [141; 195].

«Kahn A. с соавторами (2003) в результате сравнения трех типов остеопластических материалов эксплантов (аллогенные, ксеногенные, аутотрансплантаты) пришли к выводу, что для увеличения объема

атрофированного альвеолярного отдела наиболее приемлемыми являются аутотрансплантаты» [163]. «Сравнение аллогенного и аутологичного трансплантатов для выполнения синус-лифтинга выявило преимущество аутологичных трансплантатов по остеоиндуктивным свойствам» [171]. По данным Chavrier С. (1997) эффективность использования трансплантатов из области подбородка для увеличения объема альвеолярного гребня достигала 88,5%. «Преимуществом данного подхода является наименьший процент резорбции после осуществления трансплантации» [134].

Gehrke S.A. (2009) описал результаты успешного применения быстро резорбируемого цемента «PDVitalOscement» для заполнения дефектов костной ткани вокруг имплантата, введенного в область удаленного зуба на верхней челюсти. Рентгенологический контроль на сроках 30, 60, 120 и 180 дней подтвердил резорбцию введенного материала и замену его на костную ткань. «Через 12 месяцев функционирования имплантата под нагрузкой вновь образованная кость полностью слилась с окружающей костной тканью» [151].

«Результаты экспериментальных и клинических исследований нового остеопластического костного цемента Norian CRS показали, что он обладает остеоиндуктивной и регенеративной активностью. На 21-е сутки наблюдалось замещение материала Norian CRS вновь образованными костными структурами» [27].

С целью наращивания объема кости альвеолярного гребня Marx R. и соавторы (1998) «использовали комбинацию костного материала с плазмой, содержащей повышенное число факторов роста» [188]. В то же время в обзоре литературы, представленным Sanchez A.R. с соавторами (2002) «отсутствуют убедительные научные доказательства эффективности применения данного метода с целью увеличения размера альвеолярного гребня» [165].

Для восстановления размеров альвеолярного гребня альвеолярной кости с посттравматическими и постэкстракционными дефектами Sandor G. с соавторами (2003) использовали трансплантаты с коралловыми гранулами. В область дефекта помещались коралловые гранулы (по 1–2 мл) для того, чтобы в последующем после

прекращения роста кости челюсти можно было установить имплантаты. «Эффективность разработанного метода составила 93,5%. Отмечено, что коралловые гранулы были более эффективны при дефектах в задних отделах верхней и нижней челюстей» [229].

В литературе описано применение полностью рассасывающихся гранул из гидроксиапатита, способствующих регенерации кости от 14% до 58% [127]. «Данная методика показала успешные результаты при одномоментной внутрикостной имплантации, описанной Ризвановым И.Р.» [104] и Темерхановым Ф.Т.» [106].

«Материалы на основе гидроксиапатита обладают хорошей биосовместимостью с костной тканью, а их пористая структура содействует быстрому врастанию в них костной ткани» [145]. Вместе с тем, остеопластические материалы по большей части выполняют каркасную функцию. «Однако не всегда удается надежно фиксировать остеопластические материалы в костной полости» [39].

Ждановым Е.В. с соавторами (2009) описаны результаты альвеолярной реконструкции у пациентов со значительной атрофией беззубой верхней челюсти с использованием кортикальных большеберцовых трансплантатов в виде блоков и стружки, а также двустороннего синус-лифтинга с помощью препарата «Bio-Oss» (гранулы). По истечении 5 месяцев устанавливали имплантаты Anthofit. «Морфологическое исследование биоптата из регенерата, отобранного в момент введения имплантатов, показало, что пересаженная костная ткань включала жизнеспособные остеобласты и остециты, по ее периферии формировались молодые костные балки» [35, 36].

1.3.2. Направленная костная регенерация с применением мембран

Для регенерации и остеокондукции используются различные биоматериалы: «костная стружка, препараты крови (обогащенная тромбоцитами плазма, тромбоцитарный гель, фибриновый гель, тромбоцитарный концентрат)»

[166; 189], «в качестве ограничительных мембран – титановые конструкции, искусственные пленки, мембраны и их комбинации» [8; 47; 48; 123; 180; 182; 256].

«Направленная костная регенерация помогает сохранять геометрию костного регенерата согласно анатомическим показателям конструкции. Мембраны, наряду с сохранением геометрии регенерата, предотвращают врастание в него соединительной и эпителиальной ткани» [15; 78; 248]. Мембраны выполняют разделительную функцию и функцию удержания костно-пластического материала в нужном направлении. «С учетом механизма действия их разделяют на нерезорбируемые и резорбируемые» [15; 193; 241; 260; 261; 262].

Главным недостатком нерезорбируемых мембран является вероятность инфицирования открытой части в период регенерации кости, что может являться причиной неблагоприятного исхода в 50 % случаев. С целью профилактики инфекции формируют запасы мягких тканей над мембраной. При этом следует учитывать, что крепление и удаление мембран требует дополнительного вмешательства и травмирует регенерируемые ткани. «Большая часть авторов отдают предпочтение органическим мембранам на основе коллагена благодаря их лучшей тканевой интеграции. Вместе с тем управление процессом костной регенерации осложняется вариабельностью срока осуществления барьерной функции» [69; 70; 125; 128; 161; 179]. «Барьерные функции мембран при условии хорошей регенерации ткани, сохраняются до 6 месяцев. Полная резорбция отмечается через 12–14 мес.» [17].

Заживление в полости рта осложняется:

1. воздействием протеолитических ферментов слюны;
2. воздействием микрофлоры полости рта;
3. сложностью пространственной конфигурацией дефектов;
4. высокой функциональной нагрузкой.

«Помимо распределения по уровню резорбции, ограничительные мембраны могут иметь перфорационные отверстия (например, титановые гибкие мембраны и сетки)» [185; 186; 219].

«Пространство между ней и воспринимающим ложем может заполняться разными остеопластическими материалами» [114; 254]. «Механизмы и стадии восстановления кости с помощью ограничительных мембран еще недостаточно изучены, несмотря на большое число публикаций по клинико-экспериментальным исследованиям и зачастую имеют описательный характер» [187; 190; 204; 205; 209; 210].

«В большинстве публикаций не приведено четких данных о том, деления на жизнеспособную и нежизнеспособную кость, а также не раскрыты вопросы о степени проницаемости мембраны, ее участия в регенерации костной ткани, в том числе в зависимости от используемого остеопластического материала» [17; 42; 128; 175; 183; 221; 222; 237].

«Направленная костная регенерация с использованием мембран достаточно широко используется в стоматологической хирургии для увеличения вертикального размера альвеолярного отдела верхней челюсти перед непосредственной дентальной имплантацией» [24; 39; 62; 99].

«В качестве мембран применяют материалы, оказывающие минимальное влияние на макрофагальную реакцию, но индуцирующие образование наиболее тонкой капсулы вокруг импланта» [74; 75].

«Полимеры молочной кислоты (полилактиды (ПМК)) считаются самыми оптимальными биodeградируемыми синтетическими полимерами» [244] и относятся к классу перспективных материалов для замещения утраченных и поврежденных тканей. «Они полностью резорбируются и элиминируются из организма естественным путем (цикл Кребса)» [258].

Механические свойства ПМК можно регулировать с помощью выраженности поперечных связей. «Также возможно насыщение имплантатов лекарственными веществами, постепенно высвобождающихся в процессе деградации ПМК для поступления в окружающие ткани» [28; 124; 138; 258].

«При установлении мембраны из ПМК в ткани происходит ее быстрое покрытие фибрином» [74; 75; 176; 272]. Далее в фибрин проникают лейкоциты и фибробласты. «Лейкоциты разжижают и лизируют фибрин, а фибробласты

начинают синтез соединительной ткани, постепенно инкапсулируют инородное тело соединительно-тканной капсулой» [74; 75].

Майбородиным И.В. с соавторами (2014) в экспериментах на самцах крыс инбредной линии установлено, что «разрушение ПМК происходит в течение длительного времени» [76]. «Возможно, причиной неполной биodeградируемости ПМК является повреждение тканей в процессе «закисления» среды» [235]. «Однако, некоторые исследователи не согласны с данным предположением» [158]. «Обычно в чистом виде полимеры органических кислот инертны, но могут закислить рану в случае быстрой резорбции в следствии воспалительного процесса, что препятствует костеобразованию» [80; 94; 143; 267].

«Известны работы о длительном лизисе ПМК» [217; 264], «в том числе при активном участии макрофагов» [217; 234].

В работе Кулакова А.А. с соавторами (2015) приведен анализ динамики состояния альвеолярной кости вокруг дентальных имплантатов. «При проведении направленной регенерации кости в группе пациентов с помощью биорезорбируемых мембран и пинов на основе ПМК вертикальная резорбция альвеолярной кости вокруг шейки имплантата не превышала 0,6–1,5 мм в 89,8% наблюдений» [145]. В группе аутокостной пластики по типу «винирной» техники составили 88,1%; в группе межкортикальной остеотомии – в 81,1%. «По мнению авторов, наилучшие результаты получены в варианте с использованием биорезорбируемых мембран ПМК» [62].

Schliephake H. и Aleyt J. (1997) в эксперименте на карликовых свиньях исследовали возможность увеличения альвеолярного отдела нижней челюсти с помощью аутологичных костных трансплантатов и резорбируемых мембран. Проведено успешное наращивание кости размером 10x12x40 мм. «Все установленные имплантаты были остеоинтегрированы в контакте кость-имплантат» [232]. «Аналогичный эффект был получен Buser D. и соавторами (1998)» [131].

Увеличение альвеолярного гребня с помощью аллотрансплантата и нерезорбируемой мембраны с титановым покрытием 20 пациентам описано Frank

Feuille V. с соавт. (2003). «Через 13 месяцев после дентальной имплантации было достигнуто образование новой кости у 42–70% пациентов» [148]. «Подобные результаты были получены Landi L. (1998)» [172].

«Метод направленной костной регенерации с помощью мембран широко применяется для заполнения костных дефектов вокруг дентальных имплантатов увеличения вертикального размера альвеолярного отдела верхней челюсти» [137; 164; 184; 207; 277; 278].

«Результаты нескольких клинических исследований показали, что методики направленной регенерации кости с применением мембран, позволяют увеличить объем кости больше, чем без мембраны» [71; 177; 178]. «Использование резорбируемых и нерезорбируемых мембран позволяет получить схожие результаты» [71; 177; 178].

«Метод направленной костной регенерации продемонстрировал свою эффективность при устранении деформаций альвеолярного гребня в экспериментах на собаках» [233], а также в клинической практике» [140; 196].

«Дальнейшее усовершенствование данной методики способствовало повышению результативности увеличения объема альвеолярного гребня» [132; 173; 197], «устранения окончатых и щелевидных дефектов в области имплантатов» [142; 240], «немедленного введения имплантатов в лунки удаленных моляров» [239; 276].

Ретроспективное исследование по анализу результатов установки 123 имплантатов со сроком наблюдения 1-5 лет было проведено Simion M. с соавт. (2001). Введенные имплантаты располагали над альвеолярным гребнем на 2-7 мм, поверх них устанавливались нерезорбируемые мембраны из политетрафторэтилена (р-ПТФЭ-мембраны). «Предложенная методика направленной костной регенерации позволила увеличить высоту альвеолярного гребня до 8 мм» [243]. «Согласно данным аналогичного ретроспективного исследования результативность операции направленной костной регенерации у курящих существенно снижена» [246].

Jung R. C и соавт. (2003) проведено сравнительное изучение эффективности использования костного морфогенетического протеина-2 (rhBMP-2), ксеногенной кости «Bio-Oss» и резорбируемой коллагеновой мембраны «Bio-Gide». «Через 6 месяцев биопсия костного материала в 76% случаев показала пластинчатое строение новообразованной кости и увеличение на 3–12 мм альвеолярного гребня при использовании резорбируемой коллагеновой мембраны «Bio-Gide»» [162]. В эксперименте с лабораторными животными Wikesjo U.M. с соавторами (2001) была подтверждена «перспективность используемого метода и его большие возможности для использования в дентальной имплантологии» [268].

«Высокая эффективность дентальной имплантации с одномоментной костной пластикой при выраженной атрофией альвеолярных отделов челюстей описана Поповым В.Ф. (2009). В 94,6% случаев отмечены высокие результаты при наращивании костной ткани внакладку и методами закрытого синус-лифтинга и сплитинга. Наибольшая эффективность (95,7%) отмечалась при использовании метода направленной костной регенерации с использованием нерезорбируемых мембран» [95].

«Ряд авторов для направленной регенерации кости предлагают использовать резорбируемые мембраны, что позволяет уменьшить риски возможных инфекционных осложнений, но вместе с тем, снижает вероятность значительного увеличения объема альвеолярной кости» [45; 181]. «Однако применение костнопластических материалов для направленной регенерации кости значительно увеличивает успешность проведения операции при недостаточном объеме аутогенной кости» [122].

«Как видно из выше приведенных данных, для реконструкции альвеолярного гребня использовались аутологичные трансплантаты, костные имплантаты, ксеногенные костные имплантаты и синтетические заменители кости, которые можно применять в сочетании с мембранами и десневыми трансплантатами» [45; 233]. «Аутологичную кость с успехом используют для увеличения ширины и высоты значительно атрофированного альвеолярного гребня» [120; 144; 149].

«De-Boever A.L. и соавторы (2003) использовали ксеногенный трансплантат («Bio-Oss») и нерезорбируемую мембрану в процессе одноэтапного введения дентальных имплантатов в узкий альвеолярный гребень. Такой прием позволил увеличить размер гребня на 5–8,5 мм» [144; 149]. «Похожие результаты получены Алымбаевым Р.С. с соавторами (2015) при удалении зубов с одномоментной установкой имплантатов с остеокompозитами «Bio-Oss», «Стимулл-Осс» и биорезорбируемой мембраной. Через 3 и 6 месяцев у всех пациентов наблюдалось образование органотипичного костного регенерата после удаления зубов перед установкой имплантатов, наличие полноценной остеоинтеграция имплантатов, отсутствие признаков воспаления околоимплантатных тканей, подвижности имплантатов. По рентгенологическим данным отсутствовали признаки резорбции кости в области шеек имплантатов» [128].

«На сегодняшний день известно достаточно работ, посвященных сравнительному клинико-экспериментальному исследованию по влиянию различных остеопластических материалов на остеогенез и регенерацию костных ран» [52; 69; 86; 112].

В хирургической стоматологии используются мембраны на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ/РНВ) и его сополимеры, отличающиеся хорошей биосовместимостью и контролируемыми сроками резорбции. Пористые мембраны на основе сополимера поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом (ПОБВ), вырабатываемого штаммом *Azotobacter chroococcum 7B*, широко используются для закрытия костных дефектов. «Эти мембраны обладают хорошими барьерными и регенераторными свойствами, высокой биосовместимостью» [44; 80].

«Для замещения костных дефектов широко используются материалы на основе коллагена «Биопласт-дент» и «Клипдент»» [3; 14; 53–58; 64; 65; 79; 113; 114]. Согласно данных производителя «ВладМиВа», материал «Биопласт-дент» имеет выраженные остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства, выпускается в виде крошки, чипсов, блоков. «Выбор той или иной формы материала зависит от размера костного дефекта пациента» [115]. «В основе остеопластического действия указанных материалов главная функция отводится их остеокондуктивным и

остеоиндуктивным свойствам, а также биосовместимости и биоинтеграции с костной тканью» [115].

Резорбируемая мембрана «Биопласт-Дент» состоит из коллагена I типа (дерма) без дополнительных сшивающих добавок. По своей морфологии представляет плотные ориентированные волокна для увеличения механической прочности. По свойствам инертна и иммуногена. «Структура коллагена позволяет произвести надежное закрытие костного дефекта. Материал полностью резорбируется без фиброзного перерождения» [115]. Резорбируемая мембрана «Клипдент-МК» включает восстановленный коллаген II типа. Его межволоконная структура составлена из поперечно сшитых полипептидных цепей. Мембрана является биосовместимой, легко моделируется, обладает оптимальной жесткостью и пластичностью. «Данные мембраны предназначены для формирования механического барьера, препятствующего миграции мягких тканей в костный дефект после хирургического вмешательства» [115].

Биодинамические характеристики:

- «биоматериалы способствуют факторам роста, агрегации тромбоцитов, остеобластов и остеокластов, что вызывает ремоделирование костной ткани и стимулирует репарацию костного дефекта» [130];
- «сохраняют барьерную функцию в процессе регенерации ткани без фиброобразований, не содержат антигенные факторы, способны интегрироваться в окружающую ткань» [130];
- легко моделируются, обладают оптимальной жесткой пластичностью; распадаются на аминокислоты под влиянием ферментов, «в ходе естественных процессов, не содержат токсичных продуктов дегенерации пациента» [115].

Однако, в условиях воспалительного процесса данный материал быстро подвергается процессу фибринолиза.

Изучение остеорепаративной активности препаратов «Клипдент», «Биопласт-дент» при «замещении костных дефектов в эксперименте на кроликах, которым в область дефекта вводился остеопластический материал, показало ускорение процессов регенерации костного дефекта челюсти по сравнению с

контролем (без использования материала) на 6–7 суток независимо от применяемых модификаторов процесса» [145].

В экспериментальном исследовании на крысах, проведенном Федоровой М.З. с соавторами (2012) по оценке цитотоксичности и способности поддерживать гистотипическую дифференцировку для восстановления дефектов костных тканей биорезорбируемой мембраны «на основе ксеноколлагена (ЗАО «ОЭЗ «ВладМиВа», г. Белгород), было установлено, что данный материал не является цитотоксичным, инкубированные на нем клетки сохраняют жизнеспособность и свои морфологические особенности. Инокулированный под кожу остеопластический материал является биоактивным и биосовместимым, в зоне дефекта отмечается его резорбция и активное протекание регенераторного процесса соединительных тканей» [110].

Сопоставление результатов морфологического исследования, выполненного Любченко А.В. с соавторами (2018) по изучению репаративного процесса на модели крыс показало, что «вкручивание титанового самореза в бедренную кость с добавлением остеопластического материала и мембраны «Клипдент МК» (ООО «ВладМиВа», Россия), активировало процесс остеогенеза по краям дефекта и в участках костных осколков, прилегающих к дефекту» [73]. «Результаты данного исследования позволили заключить, что остеопластический материал «Клипдент ПЛ» в комплексе с мембраной «Клипдент МК» эффективно стимулируют репарацию костной ткани» [73].

«Сравнительное исследование структурной и морфологической характеристики костной ткани нижней челюсти человека и остеопластического материала «Биопласт-дент» («ВладМиВа», г. Белгород) показало, что остеопластический материал «Биопласт-Дент» имеет схожую с костной тканью человека морфологию и систему сопряженных пор, что позволяет успешно применять данный материал в целях оптимизации процессов остеорепарации при лечении костных дефектов челюстно-лицевой области» [114].

Таким образом, на сегодняшний день для устранения атрофии альвеолярного отдела челюсти при частичном или полном отсутствии зубов разработаны

различные остеопластические материалы и методики хирургического вмешательства. При этом метод направленной регенерации с использованием резорбируемых и нерезорбируемых мембран нашел более широкое использование.

1.3.3. Лекарственные средства на основе наночастиц серебра

В медицинской литературе наночастицы (НЧ) определены как искусственно созданные молекулярные конструкции. К этому классу, как правило, относят наноструктуры, созданные на основе оксида кремния и различных металлов (золото, серебро, платина). Обычно наночастица в своем составе имеет кремниевое ядро и внешнюю оболочку, состоящую из атомов металла. Использование металлов дает возможность создавать переносчики с уникальными свойствами. Особенно выделяют наночастицы цинка, титана и железа. «Их применение в медицине позволяет эффективно доставлять биологически активные молекулы через различные барьеры организма (кожный, гематоэнцефалический), а также существенно изменять характер действия лекарственного препарата» [1].

«Для получения наночастиц серебра (НЧ Ag) разработано множество физических и химических способов» [136; 174; 202; 203; 216; 266; 271]. «Существуют даже методики получения НЧ Ag с помощью микроорганизмов» [273].

На сегодняшний день абсолютно точно доказано, что серебро характеризуется выраженными бактерицидными, противовирусными, противогрибковыми и антисептическими свойствами и считается наиболее эффективным обеззараживающим средством в борьбе с патогенными микроорганизмами. Вместе с тем серебро является тяжелым металлом, насыщенные растворы которого могут быть вредны для человеческого организма. Предельно допустимая концентрация серебра составляет 0,05 мг/л. Концентрация солей серебра 2 г вызывает острые токсические явления; 10 г – является летальной. Поэтому используются НЧ Ag [104].

Уникальные антимикробные и противовирусные качества соединений серебра многосторонне изучены [49; 60; 119]. Антибактериальные свойства металлического серебра связаны с его медленным окислением и переходом в окружающую среду ионов серебра – Ag^+ . Наночастицы серебра отличаются высокой бактерицидной активностью за счет своей развитой поверхности, создающей наибольший контакт с окружающей средой. Кроме того, благодаря малым размерам, они способны проникать через клеточные мембраны, оказывая влияние на внутриклеточные процессы изнутри [105].

«В результате исследования, проведенного Фроловым Г.А. и соавторами выявлено, что «Ионы металлов и их диссоциированные соединения вызывают гибель микроорганизмов, наиболее сильным бактерицидным действием обладает серебро, меньшим – медь и золото. Мы зафиксировали в ходе исследования, что при использовании ополаскивателя на основе оксидов металлов значительно снижается количество мягкого зубного налета на поверхностях зубов (до 83%), снижается количество патогенной микрофлоры вплоть до полного её уничтожения...» [127].

Исследования, посвященные влиянию НЧ Ag на жизнедеятельность грамотрицательных микроорганизмов, показали, что при концентрации серебра 75 мкг/ мл^{-1} в питательной среде отмечается резкое прекращение роста патогенных микроорганизмов. Причем, этим свойством обладали только индивидуальные НЧ, а не их агломераты. Кроме того, размеры НЧ на мембране клетки не превышали размеров НЧ внутри клетки. На этом основании был сделан вывод, что только кластеры, способные к взаимодействию с клеточной оболочкой, могут внедряться в цитоплазматическое пространство [50].

Бактерицидный эффект НЧ Ag сильно зависит от их размера и увеличивается с его уменьшением. «Только НЧ с диаметром менее 10 нм были способны к прямому взаимодействию с бактерией. Вероятно, этим обстоятельством и обусловлена высокая биологическая активность частиц диаметром $<10 \text{ нм}$ » [105].

Несмотря на то, что изучение фундаментальных вопросов, связанных с механизмом антибактериального действия НЧ Ag еще только изучается,

появляется все больше научных публикаций об использовании бактерицидных свойств НЧ Ag в отраслях прикладной медицины и промышленности. «В связи с тем, что НЧ Ag обладают высоким антимикробным действием в различных средах, открывается многообразие способов их применения и создания материалов и изделий медицинского назначения» [105]. «Так, соединение на основе природного полисахарида арабиногалактана и НЧ Ag размером 10–30 нм обладает хорошим антимикробным действием в отношении ряда патогенных микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*» [4] и «широко используется в качестве наружного антисептического средства в фармакологии, медицине» [105].

«Еще одним важным качеством НЧ Ag является их выраженный антибиопленочный эффект и отсутствие выработки реакции резистентности» [23]. «Использование НЧ Ag в стоматологической практике выявило их высокую активность в отношении микроорганизмов и биопленок, в сравнении с ранее используемыми хлоргексидином и нитратом серебра» [100; 109]. «Доказано, что НЧ Ag вызывают деструкцию биопленок, образованных полирезистентными штаммами микроорганизмов» [88; 116].

«Многообещающие результаты НЧ Ag получены на модели перитонита и менингоэнцефалита *in vivo*» [100]. «НЧ Ag широко используются в качестве антимикробного агента в производстве различных средств упаковки, перевязки и водоэмульсионных красок, и эмалей» [238; 249]. Ткани с нанесенными НЧ Ag обладают самодезинфицируемыми свойствами, что является незаменимым «свойством для медицинских халатов, постельного белья, детской одежды, антигрибковой обуви и т.д. Наночастицы долго сохраняют бактерицидные свойства после их нанесения на поверхность твердых поверхностей, включая дерево, стекло, керамику, бумагу, оксиды металлов и др. Данное свойство дает возможность создания эффективных дезинфицирующих аэрозолей с длительным сроком действия для бытового применения» [130; 168].

«Главный механизм антибактериального действия НЧ Ag основан на их фиксации и проникновении в клеточную стенку, модулировании сигналов с

помощью дефосфорилирования» [135; 206]. Антивирусное действие НЧ Ag основано на том, что «через оболочку вирусов при ее поражении НЧ прекращается поступление кислорода, что предотвращает процесс окисления глюкозы в микроорганизме, и он остается без источника энергии. Более совершенные стенки клеток человека или животных при этом не повреждаются» [152].

«Имеются публикации по созданию новых раневых покрытий, содержащих в своем составе наночастицы металлов» [7; 16; 51]. «Частицы могут быть кристаллическими или аморфными и иметь форму сферы, пирамиды, стержня, пентагона, нанопроволоки. Они эффективно подавляют аэробную, анаэробную, грамположительную и грамотрицательную микрофлору, в том числе устойчивую к антибиотикам» [88].

«Из литературных источников известно, что серебро и золото являются мощными иммуномодуляторами, по своей активности сравнимыми со стероидными препаратами» [270]. В зависимости от дозы они могут стимулировать или угнетать процесс фагоцитоза. «Под действием НЧ происходит увеличение количества иммуноглобулинов классов А, М, G и Т-лимфоцитов, что может быть использовано для лечения различных патологий, вызванных микроорганизмами, в том числе заболеваний пародонта» [12]. «Полимерные нанокompозиты являются наиболее востребованными на сегодняшний день и создаются на основе полимерных матриц: полипропилена, полистирола, полиамида или нейлона и др.» [233]. «В качестве нанонаполнителей рекомендуется использовать различные НЧ, усиливающие и изменяющие их свойства: частицы оксидов алюминия, кремния, титана, наночастиц серебра, золота, алюминия, меди» [11; 92; 93].

«ПМК обладают необходимыми механическими свойствами, регулируемые с помощью изменения степени полимеризации и выраженностью поперечных связей. Имплантаты можно дополнять лекарственными веществами, способными высвободиться в ходе деградации ПМК и медленно поступать в окружающие ткани» [28; 124; 138; 258]. «Исследования, связанные с перспективами использования коллоидных растворов наночастиц металлов в

качестве антибактериального компонента в составе изолирующих мембран для направленной регенерации кости являются весьма актуальными» [12].

«Результаты изучения влияния НЧ Ag на регенерацию костной ткани челюстей показали, что применение стоматологической губки "Стимул-Осс", смоченной азотнокислым нанораствором серебра, стимулирует регенерацию костной ткани и может использоваться на этапах дентальной имплантации» [84].

«В экспериментальных исследованиях на крысах было изучено противовоспалительное действие НЧ золота и серебра при моделировании процесса воспаления тканей десны при воздействии кишечного эндотоксина (липополисахарида, ЛПС). Установлено антибактериальное действие частиц НЧ золота или серебра в составе силикагелевого носителя и способность угнетать воспалительный процесс» [13]. «В частности, НЧ золота в большей степени способствовали восстановлению активности лизоцима, снижение которой наблюдалось при развитии экспериментального воспаления слизистой рта, вызванного действием ЛПС. С помощью микробиологических исследований подтверждено выраженное антибактериальное действие препаратов с НЧ золота на стандартные штаммы микроорганизмов и условно-патогенную микрофлору корневых каналов» [13]. «Десневые аппликации геля с НЧ золота (5 нм, 500 мкг/г) с протаминсульфатом в экспериментах на моделях пародонтита у крыс снижали степень дисбиоза и атрофии альвеолярного отростка» [12].

«При операции направленной костной регенерации Tinti C. с коллегами (1997) вокруг имплантатов нижней челюсти был установлен золотой каркас в комбинации с нерезорбируемой мембраной. Через 12 мес. эта система была удалена. Биопсия во всех случаях показала наличие новой регенерированной костной ткани» [251].

«Для восполнения костной ткани вокруг имплантата при проведении немедленной имплантации применяются костнозамещающие материалы, вводимые с помощью инъекционной иглы» [102; 103]. Воложин А.И. с соавторами (2000), изучая особенности тканевой реакции на имплантацию инъекционного полиакрилатного геля, содержащего ионы серебра Ag⁺ и гидроксиапатита (ГА) в

экспериментах на крысах установили, что инъекционная имплантация сопровождалась слабо выраженной воспалительной реакцией, хронически поддерживаемой вследствие постепенной, очень медленной пристеночной макрофагальной резорбции и лизиса. «Несмотря на бактериостатическое действие серебра, воспалительная реакция сохранялась. Добавление в гель ГА способствовало усилению воспалительной и пролиферативной реакции ткани на имплантацию» [21].

«В связи с этим, вопрос применения средств направленной регенерации с перспективами использования коллоидных растворов наночастиц металлов в качестве антибактериального компонента в составе изолирующих мембран сохраняет свою актуальность» [24; 39; 99].

Таким образом, наноструктурирование биологически активных веществ с помощью полимеров позволяет создавать новые препараты с антибактериальными свойствами. На сегодняшний день чрезвычайно актуальным является вопрос поиска принципиально новых лекарственных средств, с высокой антибактериальной активностью, позволяющих значительно снизить масштабы применения антибиотиков. Пока в хирургической стоматологии не существует изолирующих мембран, обладающих антибактериальным действием. Исследования, связанные с перспективами использования коллоидных растворов НЧ Ag в качестве антибактериального компонента в составе изолирующих мембран для направленной костной регенерации, являются весьма актуальными.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая структура экспериментального исследования

Эта глава посвящена методам и материалам экспериментальных исследований по разработке модифицированной мембрана с антибактериальными свойствами на полимерной основе, обработанной гидрозолем наночастиц серебра (PLA-Ag) для повышения эффективности устранения дефектов костной ткани при использовании трансплантатов или имплантатов, методом направленной костной регенерации и изучения ее свойств.

Данные исследования основывались на принципах доказательной медицины и проводились поэтапно на базе кафедры челюстно-лицевой хирургии имени академика Н.Н. Бажанова Института стоматологии имени Е.В. Боровского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), лаборатории ООО «Фибрасофт» и ФГБУ «9 Лечебно-диагностический центр» Минобороны России, ФГАОУ ВО НИТУ МИСиС.

В экспериментальные исследования включили четыре этапа:

- I этап: разработка методики нанесения гидрозоля наночастиц серебра Ag на мембрану;
- II этап: исследование мембраны, с нанесённым на неё наночастицами Ag, на культуре клеток *in vitro*;
- III этап: изучение биосовместимости разработанной мембраны *in vivo* на живой животной модели;
- IV этап: исследование влияния разработанной мембраны на регенерацию костной ткани в эксперименте на животных.

2.2. Материалы и методы

2.2.1. Методика получения мембраны на основе полилактида

В исследованиях применялась мембрана «полилактид-фиброин» (PLA-FR) производства ООО «Фибрасофт», г. Москва.

Состав мембраны PLA-FR: полилактид – 50% + шелк – 50% (1:1).

В процессе синтеза использовались раствор полилактида (100 мг/мл) «Sigma-Aldrich Co. LLC» (США) и раствор фиброина шелка (100 мг/мл) «Xi'an Lyphar Biotech Co., LTD» (Китай) в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол-2 «Sigma-Aldrich Co. LLC» (США).

Характеристика полилактида «Sigma-Aldrich Co. LLC» (США):

Тип полимера: L-полилактид

Плотность, г/см³: 1,23±0,05 ПТР, г/10 мин (190⁰С/2,16 кг): 2-5

Температура плавления, ⁰С: 150-155

Температура стеклования, ⁰С: 57-60

Модуль упругости при растяжении, ГПа: 3,5-6,0

Ударная вязкость, Дж/м: 10-13

Предел прочности при растяжении, МПа: 30-50

Относительное удлинение при разрыве 5: 3-5

Получение раствора фиброина шелка в растворителе. Раствор полимера получали путем растворения высушенной пленки из фиброина шелка в 1,1,1,3,3,3-гексофторизопропанол-2 («Пим-инвест», Россия) при температуре 37⁰С до концентрации 75 мг/мл.

Изготовление мембраны. Для изготовления мембраны использовали метод электроспиннинга. Электроспиннинг, или электроформирование, представляет собой процесс получения нановолокон из раствора различных полимеров под действием электростатических сил [275]. При нанесении таких покрытий на поверхность раны происходит контролируемое пролонгированное высвобождение молекул биологически активных веществ или факторов роста, антибиотиков и

прочих соединений, что положительно сказывается на динамике заживления и значительно сокращает сроки выздоровления. Схема стандартной установки для изготовления мембраны методом электроспиннинга приведена на Рисунке 2.1.

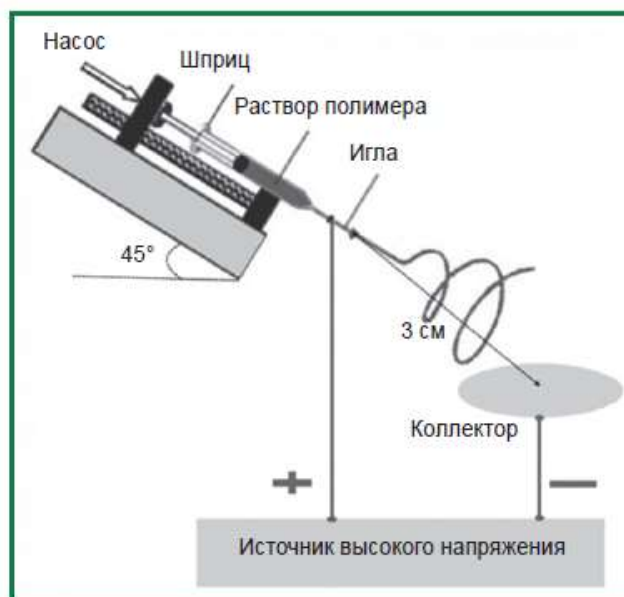


Рисунок 2.1 – Схема установки для изготовления мембраны

Установка, представленная на Рисунке 2.1, состоит из отрицательно заряженного коллектора, шприца с тупоконечной иглой, соединенной с источником высокого напряжения, и насоса. В ряде экспериментов были подобраны оптимальные параметры установки, чтобы работать с растворами фиброина шелка и полилактида.

Насос установили под углом 45° к плоскости опоры, между коллектором и концом иглы расстояние 3 см. Изменение параметров установки позволяет изменять диаметр и плотность распределения волокна и позволяет получать конструкции с заданным показателем пористости.

1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол-2, использованный в качестве растворителя, часто используется как растворителей для электроспиннинга вследствие его высокой летучести и позволяет обеспечить быстрое высыхание волокна в процессе его оседания на коллекторе. Методом электроспиннинга были изготовлены образцы мембраны на основе двух полимеров – фиброина шелка и

полилактида в соотношении (PLA) 1:1. Образец мембраны представлял собой равномерно распределенные по поверхности стекла волокна, уложенные в несколько слоев размером 1×1 см в виде пленок толщиной 0,2–0,23 мм (Рисунок 2.2).



Рисунок 2.2 – Внешний вид мембраны PLA, полученной методом электроспиннинга

Раствор полимера подавался из фильеры. Под действием электрического поля капля полимера вытягивалась в нить и укладывалась на плоский неподвижный электрод-коллектор. Электрораспыление осуществлялось одновременно из 6 игл с внутренним диаметром 0,8 мм. Расстояние до коллектора составляло 35 см, напряжение между электродами – 60 кВ. После изготовления матрицы оставляли под тягой на 24 часа для полного удаления растворителя. Установка электроспиннинга состояла из двух высоковольтных блоков +50 кВ и – 20 кВ, шприцевого насоса и алюминиевого коллектора. Положительное напряжение подавалось на иглу шприца, отрицательное на коллектор. После формирования пленка разрезалась на куски, размером 1×1 см. Упакованные образцы стерилизовались методом радиационного облучения в соответствии с ГОСТ ISO 11137-1. Доза облучения составляла от 15 кГр до 25 кГр.

2.2.2. Методики измерения физических свойств мембраны

Определение толщины образцов мембраны выполняли с помощью микрометра с ценой деления 0,01 мм (ГОСТ 6507-90). Каждый образец измеряли 3–5 раз. Погрешность измерения не превышала 0,01 мм (2%).

Определение структуры мембраны выполняли методом *сканирующей электронной микроскопии*. Образцы мембран фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в фосфатно-солевом буфере, дегидратировали в этаноле в концентрациях: 10, 30, 50, 70, 95% и заливали ацетоном («Химмед», Россия). Далее образцы высушивали в приборе НСР-2 (Hitachi Ltd., Япония). На высушенные образцы наносили слой хрома толщиной 20 нм в атмосфере аргона при давлении 0,1 мм рт. ст. и ионном токе 6 мА с использованием прибора IonCoater IB-3 (Eiko Engineering, Япония) и анализировали на растровом электронном микроскопе «Tescan» «Vega 3SB» (Рисунок 2.3).

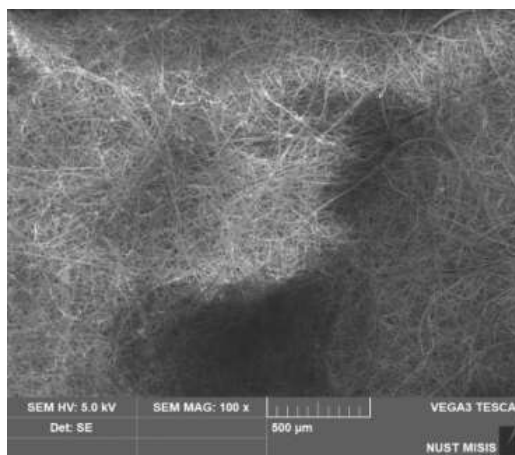


Рисунок 2.3 – Микрофотография мембраны PLA, полученная с помощью растрового электронного микроскопа «Tescan» «Vega 3SB»

2.2.3. Методики получения гидрозоля наночастиц серебра (Ag)

Получение гидрозоля наночастиц серебра Ag в виде препарата «НанАргол» осуществляли цитратным методом на специально сконструированной установке.

Препарат «НанАргол» представляет собой раствор безионного коллоидного серебра. Номер свидетельства: RU.77.99.11.003. E.001609.03.13. Дата регистрации и переоформления: 01.03.2013. Декларация о соответствии: ТС RU Д-RU.ПК04. В.00234.

Состав: коллоидное наносеребро – 0,2 мг/мл, измеренное при температуре $23\pm 2^{\circ}$ С, вода, натрий лимоннокислый.

Свойства: препарат обладает пролонгированным бактерицидным эффектом в отношении штаммов анаэробной микрофлоры наддесневого и поддесневого зубного налета.

Для работы были использованы водные и водные диализованные дисперсии наночастиц серебра (производство ООО НПК «Наномет», Москва).

Определение размера наночастиц серебра проводили на приборах Coulter N4 MD (Coulter Electronics, США) и Horiba LB 550 (Horiba, Япония) методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС).

С помощью микроскопа LEO912 AB OMEGA (Carl Zeiss, Германия) была проведена микрофотография наночастиц, методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ).

Нанесение гидрозоля наночастиц серебра Ag на мембрану было основано на пропитке мембраны PLA методом погружения до состояния полного впитывания. И последующего кратковременного нахождения её непосредственно перед применением в концентрированном растворе гидрозоля серебра препарата «НанАргол».

2.2.4. Характеристика и свойства мембраны сравнения («Биопласт-Дент»)

Для экспериментальных исследований в качестве сравнения была использована мембрана «Биопласт-дент», производства ЗАО «ОЭЗ «ВладМиВа» (г. Белгород, Россия) (Рисунок 2.4).

Резорбируемая двухслойная мембрана «Биопласт-Дент» представляет собой коллаген I типа (дерма), не содержит дополнительных сшивающих добавок.



Рисунок 2.4 – Внешний вид мембраны «Биопласт-Дент» (ЗАО «ОЭЗ «ВладМиВа», г. Белгород, Россия)

По своей структуре для увеличения механической прочности мембрана имеет морфологию плотных ориентированных волокон, иммуногенна, инертна, соответствует требованиям российских и международных стандартов ISO 13485-2003 и ГОСТ ISO 9001-2011 [115].

2.2.5. Методика исследования деградации мембраны

С целью анализа взаимодействия наносодержащего имплантата со средой живого организма проводилось изучение скорости деградации образцов мембран в физиологическом водном 0,9 мас. % растворе NaCl, имитирующем свойства сыворотки крови.

Для исследования использовались образцы мембран PLA и PLA-Ag; в группе сравнения – образец мембраны «Биопласт-Дент», размерами 1x1 см. Образцы мембран взвешивали на лабораторных аналитических весах AND HR-100A. После помещения образцов в лунки планшета добавляли по 10 мл имитирующего раствора. Смоченные образцы взвешивали, затем культуральные планшеты с образцами помещали в термостат при температуре 37 °С (Рисунок 2.5).

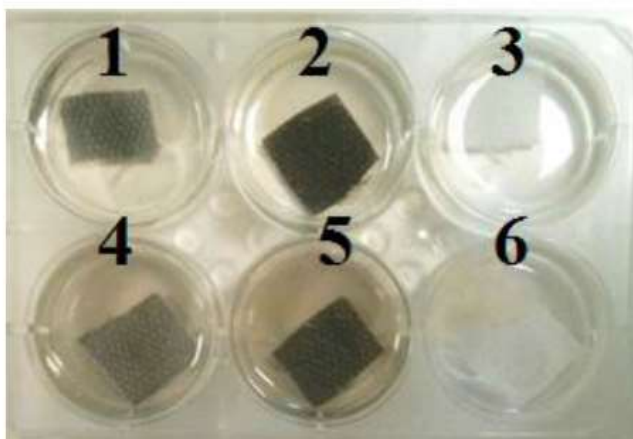


Рисунок 2.5 – Размещение образцов исследуемых мембран в лунках культурального планшета: №№1,4 – мембраны из «полилактид-фиброина» PLA-FR; №№2,5 – мембраны из «полилактид-фиброина» с наночастицами серебра PLA-FR–Ag; №№3,6 – мембрана «Биопласт-Дент»

Во время проведения эксперимента массу образцов измеряли в следующие периоды времени: 1 ч, 3 ч, 1 день, 3 дня, 5, 7, 10 дней. Затем образцы извлекали из раствора и высушивали при комнатной температуре.

2.3. Методики экспериментальных исследований мембран в условиях *in vitro*

2.3.1. Исследование токсичности гидрозоля наночастиц серебра на биотест-объекте *Daphnia magna* Straus

Оценку токсичности коллоидного раствора наночастиц серебра «НанАргол» проводили по показателям смертности/выживаемости рачков дафний (*D. magna* straus). Использовались следующие концентрации гидрозоля наночастиц серебра: 0,001; 0,002; 0,02; 0,2; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 мг/мл. В контрольной группе использовали растворы без наночастиц серебра. Острым токсическим действием соединения считалась гибель $\geq 50\%$ рачков за 48 часов.

Тестирование заключалось в погружении 10 дафний (возраст 6–24 ч.) в биологическую пробирку 100 см³ с 50 см³ воды, содержащей растворы наночастиц серебра. Начиная с контрольной пробы, рачков подсаживали в пробирки с

помощью сачка. Все пробирки с вариантами эксперимента помещали на 48 часов в климатостатическую камеру. Все опыты проводили в трех повторах.

Подсчет смертности *Daphnia magna* Straus осуществляли через каждые 24 часа. При наступлении гибели более 50% особей в течение 24 ч. эксперимент прекращали. Неподвижных рачков в течение первых 15 секунд после легкого покачивания пробирки считали погибшими. Через 48 часов подсчитывали число выживших/погибших особей, рассчитывали жизнеспособность/выживаемость (%).

2.3.2. Исследование цитотоксичности мембран

2.3.2.1. Исследование цитотоксичности мембран на культурах клеток нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов

При помощи центрифугирования из периферической крови выделяли фракцию мононуклеарных лейкоцитов, скорость 500 g в градиенте плотности Ficoll-Raque (Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) в течении 10 минут. Полученную взвесь клеток неоднократно отмывали от реактива фосфатным буфером, после чего культивировали при температуре 37 °C в конических пластиковых пробирках объемом 15 мл в концентрации 3×10^6 нуклеаров/мл культуральной среды 10 mM буфера HEPES (Sigma-Aldrich, США, 100% среды DMEM/F12 (1:1), Gibco Life Technologies США, 280 мг/л L-глутамина (Sigma-Aldrich, США)).

Мононуклеарные лейкоциты инкубировали в течение 4 часов при температуре 37°C с образцами мембран, после чего разово отмывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР) (200 g, 3 мин) и в течение 10 минут фиксировали 70% этиловым спиртом в чашках Петри (Corning, USA). Затем проводилось окрашивание раствором пропидиума иодида (PI) ($5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл, 30 сек). Последним этапом учитывая процент окрашенных из 100 просмотренных клеток проводилось пятикратное промывание. С объективом x100 на микроскопе Olympus IX71 (Japan) проводилась оценка мазков. Контролем токсичности служила клеточная взвесь без мембран.

Нейтрофильные гранулоциты были извлечены из венозной крови у здоровых доноров в двойном градиенте фиколла-урографина, неоднократно отмывались ЗФР и взвешивались в концентрации 1 млн. кл/мл. К началу эксперимента по тесту с PI (Sigma, USA) число живых клеток оценивалось в 98–99%. В соответствии с рекомендациями ISO 10993-5 способность клеток к выживанию оценивали по их способности не окрашиваться в 0,4%-м растворе трипанового синего (Sigma-Aldrich, США). Количество окрашенных или неокрашенных клеток определялось в камере Горяева с помощью микроскопа ZEISS Axio Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия). Процентное соотношение живых и погибших форм Jurkat Т-клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии на аппарате Guava EasyCytePlus (Millipore, США) с использованием реагента и программы Guava Via Count (Millipore, США).

2.3.2.2. Исследование индекса выживаемости лейкоцитов

Индекс выживаемости лейкоцитов вычисляется на основании подсчета отношения лейкоцитов, обнаруженных после контакта с образцом, к количеству лейкоцитов в контрольном образце, представляющим собой цельную кровь без добавления образца. Подсчет осуществляется по стандартной методике с использованием камеры Горяева.

Камера Горяева представляет собой «толстое предметное стекло с 4 желобами в средней части, между которыми находятся три узкие площадки, средняя из которых ниже боковых на 0,1 мм и разделена пополам поперечным желобком. По обе стороны от этого желобка расположены сетки, нанесенные на стекло. Сетка Горяева состоит из 225 больших квадратов, из которых 25 расчерчены вертикальными и горизонтальными линиями на 16 малых квадратов. Подсчет лейкоцитов ведут в счетной камере Горяева под малым увеличением микроскопа в 100 неразграфленных больших квадратах. Большой квадрат равен 16 малым» [130]. Размеры малого квадрата камеры Горяева составляют 0,05×0,05 мм, размеры большого квадрата – 0,2×0,2 мм. Объем жидкости, помещающейся под

одним большим квадратом (0,1 мм – высота одного слоя крови), составляет 0,004 мм³ (мкл) = 1/250 мм³ (мкл). Общий объем камеры равен 0,9 мм³ (мкл).

Порядок проведения исследований:

1. Маркировка пробирок.
2. Стерилизация образцов мембран ультрафиолетом в течение 20 минут с обеих сторон.
3. Помещение образцов мембран в стерильные пробирки.
4. Добавление в пробирки по 1,5 мл свежей крови человека.
5. Введение по 1,5 мл разводящей жидкости и 0,02 мл крови после контакта с образцом в чистую пробирку. Полученное разведение считалось равным 1:20. Раствор 3-5% уксусной кислоты, подкрашенный метиленовым синим (уксусная кислота разрушает эритроциты, метиленовый синий окрашивает ядра лейкоцитов) использовался в качестве разводящей жидкости.
6. Заполнение камеры Горяева. Пробирку с разведенной кровью тщательно встряхивали. Хорошо вымытое и высушенное покровное стекло накладывали на выступающие боковые края. Далее проводили заполнение жидкостью из пробирки пространство между покровным стеклом и камерой.
7. Производили подсчет клеток после их оседания (через 1 минуту). В квадрате считали клетки, находящиеся внутри его, а также касающиеся левой и верхней границ. Клетки, касающиеся правой и нижней границы, при подсчете не учитывались.

Для получения значения числа лейкоцитов в 1 мкл, полученное при подсчете число, умножали на 50 (верно для 20-кратного разведения).

2.3.2.3. Исследование антимикробной активности мембран

Исследование антимикробной активности мембран проводили диско-диффузионным методом (МУК 4.2.1890-04) на клинических штаммах *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с инфекционными осложнениями после установки стоматологических имплантатов.

Питательные среды подбирали для исследуемых микроорганизмов и готовили из сухой среды промышленного производства. После автоклавирования питательную среду слоем до 4 мм разливали в стерильные чашки Петри (\varnothing 90 мм).

Для посева на чашки из суточных бактериальных культур готовили бактериальные взвеси в 0,15 М NaCl (рН 7,0). Культивирование бактериальных культур проводили при температуре 37⁰ С. в течение 24 часов. Оценку выросших колоний на чашках с агаром выполняли с учетом следующей шкалы: сплошной рост «+++»; скудный рост «++»; единичные колонии «+»; отсутствие роста «-» (Рисунок 2.6).

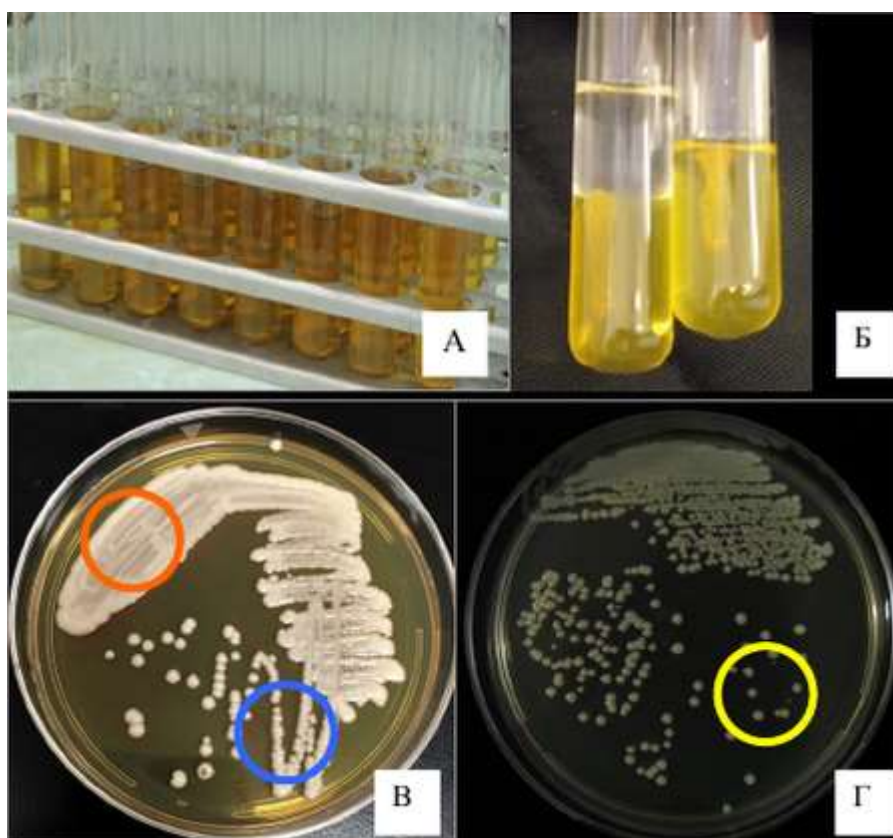


Рисунок 2.6 – Изучение антимикробной активности на суточных культурах штаммов микроорганизмов: а) сахарный бульон; б) бульонная культура с инкубированными в ней мембранами; в) зоны роста микроорганизмов на агаризованной питательной среде: сплошной рост (выделение красным цветом); скудный рост (выделение синим цветом); г) зоны роста микроорганизмов: единичные колонии (выделение желтым цветом)

2.3.2.4. Исследование цитокондуктивности и биосовместимости мембран

Для исследования цитокондуктивности и биосовместимости материала мембран была исследована пролиферативная активность клеток соединительной ткани – фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ) на их поверхности из коллекции культур тканей ФГБУ НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского Минздрава России.

На 10 образцах мембран PLA-Ag9 (n=5) и PLA (n=5) размером 1×1 см была высажена культура клеток ФЭЧ, которые затем инкубировались на среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки в культуральных планшетах в течение 24 и 72 ч при 37 °С в условиях насыщающей влажности в атмосфере с 5% CO₂.

После определенного периода инкубации (24 ч и 72 ч) был проведен анализ роста ФЭЧ с помощью флуоресцентной микроскопии окрашенных клеток. Бромистый этидий (EtBr) – это интеркалирующий агент, который благодаря своей способности образовывать прочные нековалентные комплексы с нуклеиновыми кислотами широко применяется в молекулярной биологии. При освещении ультрафиолетовым светом EtBr флюоресцирует оранжевым цветом [59].

В культуральную среду, на образцах мембран с инкубированными клетками, добавляли флуоресцеиндиацетат (FDA) до конечной концентрации 25 мкг/мл и бромистый этидий до конечной концентрации 1 мкг/мл, затем инкубировали 5 мин при 37⁰ С. После чего клетки трехкратно промывали средой без сыворотки, далее при длине волны возбуждения 280 нм с использованием красно-оранжевого фильтра TRITC (CY3) просматривали на флуоресцентном микроскопе Olympus (BX43).

Изображения ядер клеток на поверхности образцов мембран были получены с помощью комплекса CytoLabView (Applied Spectral Imaging, Израиль), включающего в себя фотокамеру и программу обработки изображений FISHView System. Поскольку при неоднородной структуре исследуемых образцов невозможно произвести фокусировку объектива микроскопа на всей плоскости

объекта, проводилось послойное изучение структуры образца в программе FISHView System.

Рост клеток на поверхности мембраны оценивали методом растровой электронной микроскопии (РЭМ). Данный метод позволил получить изображения клеток на поверхности мембран, а также исследовать взаимодействие клеток с наночастицами серебра, входящими в состав мембраны PLA-Ag.

Перед проведением эксперимента образцы стерилизовали под УФ излучением в течение 1 ч. Затем на образцы высаживали фибробласты эмбриона человека (ФЭЧ) в культуральной среде DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотика гентамицина.

После этого культуральные планшеты с образцами и клетками помещали в атмосферу CO₂ при 37 °С. Через 3, 48, 72 час образцы извлекали из термостата, после чего производили фиксацию клеток на поверхности образца. В лунку с образцом на 30 мин добавляли 2 мл 2,5 % раствора глутарового альдегида. После 30 мин выдержки в растворе, раствор удаляли, и образцы промывали буферным раствором и затем обезвоживали путем промывки спиртом с возрастающей концентрацией: 50, 70 и 90 %.

Образцы мембран PLA-Ag и PLA с зафиксированными клетками исследовали на микроскопе JSM – 50a. Образцы закрепляли на алюминиевом столике проводящей углеродной клейкой лентой для стекания заряда. Исследования проводили в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении электронной колонны 5 кВ и токе электронного зонда 50 пА.

2.4. Экспериментальные исследования мембран на моделях *in vivo*

2.4.1. Набор животных и дизайн исследования

Экспериментальные исследования *in vivo* были выполнены: на 9 белых крысах (самки, возраст 3–4 мес.; масса 300–350 г); на 24 кроликах породы Шиншилла (самцы, возрастом 3–5 лет; масса 3,8–3,9 кг). Все животные

содержались в виварии при 15-часовом световом дне, при температуре +22⁰С. Содержание животных и все манипуляции проводились в соответствии с приказом Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 года N 708н "Об утверждении Правил лабораторной практики" (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 N 18713).

Эксперименты с животными соответствовали рекомендациям и регулирующим стандартам:

- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»;
- ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;
- ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»;
- ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными»;
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944с.

Использование животных в рамках настоящего исследования было рассмотрено комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (IACUC) Сеченовского университета на предмет соответствия Политике работы с лабораторными животными и нормативным документам, регулирующим работу с лабораторными животными (Протокол №1/26 от 14.07.2017 г.).

В соответствии с регламентом санитарно-эпидемиологического и ветеринарного законодательства лабораторные животные перед экспериментом находились на карантине в течение 2 недель. Затем выполняли хирургическое вмешательство по имплантации остеопластических мембран (Таблица 2.1, Таблица 2.2).

Таблица 2.1 – Дизайн исследования по изучению токсичности мембран при имплантации в подкожный карман самкам белых крыс (n=3; N=9)

| Группа | Имплантация под кожу в область межлопаточного пространства | |
|--|--|-------|
| | 1-21 сутки | всего |
| PLA-Ag | 3 | 3 |
| PLA (контроль 1) | 3 | 3 |
| Стерильные диски из биологически инертного стекла (контроль 2) | 3 | 3 |
| Итого | 9 | 9 |

Таблица 2.2 – Дизайн исследования регенерации костной ткани мембран на критическом дефекте свода черепа самцов кролика породы Шиншилла с учетом сроков выведения животных из эксперимента (n=4; N=24)

| Группа | Критический дефект свода черепа | | | |
|----------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------|
| | 14 сутки | 28 сутки | 42 сутки | всего |
| PLA-Ag | 4 | 4 | 4 | 12 |
| PLA (контроль) | 4 | 4 | 4 | 12 |
| Итого | 8 | 8 | 8 | 24 |

2.4.2. Методики оперативного вмешательства

Животных в эксперименте оперировали под внутривенным наркозом «Золетил-100» (Франция), в качестве основного препарата, в дозе 5 мг/кг на 5% растворе глюкозы, и поддерживающего внутримышечно раствор «Рометар» (США) 1 мл на 10 кг веса.

По завершению хирургического вмешательства и после пробуждения животного от наркоза его помещали на 2 дня в отдельную клетку с соответствующим послеоперационным уходом. После проведения оперативного вмешательства всем животным была проведена антибактериальная терапия, введен антибиотик цефазолин (Sandoz, Австрия 25мг/кг).

По соответствующему протоколу, срок наблюдения составил 14, 28, 42 дня. В данные сроки выводили животных из эксперимента, производили забор исследуемого материала в послеоперационной области, полученный материал отправляли на гистологическое исследование.

2.4.3. Исследование токсичности *in vivo*

Для проведения токсикологических испытаний образцы мембран были подвергнуты циклам дезинфекции, предстерилизационной очистке и газовой стерилизации оксидом этилена в соответствии с требованиями МУ 287-113 от 30.12.98 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» и ГОСТ ISO 11135-2012 «Валидация и текущий контроль стерилизации оксидом этилена». Экспериментальные образцы мембран при этом были упакованы в стерильные индивидуальные упаковки.

Эксперимент проводили на 9 самках белых крыс, массой 300-350 г. За сутки до операции животных не кормили. Непосредственно перед вмешательством проводили депиляцию волосяного покрова (шерсти) в области спины. Образцы мембраны устанавливали под кожу в область межлопаточного пространства. Животным контрольной группы имплантировали стерильные диски, выполненные из биологически инертного стекла.

Операция осуществлялась в стерильных условиях. Кожу спины обрабатывали антисептическим раствором и выполняли разрез микрохирургическими ножницами. Подкожные карманы для установки имплантов формировали с помощью стерильного пинцета. После имплантации разрезы закрывали стерильным хирургическим шовным материалом и обрабатывали антисептиком.

После операции животные были помещены в индивидуальные клетки, с соблюдением надлежащих условий содержания и кормления. По истечении 21 суток была произведена гуманная эвтаназия всех животных из экспериментальной и контрольной группы, и оценена биологическая реакция на имплантацию в соответствии с ГОСТ ISO 10993-6-2011.

2.4.4. Исследование регенерации костной ткани на критическом дефекте свода черепа кролика породы Шиншилла

Под внутривенным наркозом (Золетил 15 мг/кг) каждому кролику в опыте, на черепе был сформирован костный дефект и на его место, установлена остеопластическая мембрана. Животные были разделены на две группы: контрольную (n = 4) – имплантация полилактидной мембраны без наночастиц Ag (PLA) и экспериментальную – имплантация полилактидной мембраны с покрытием наночастицами коллоидного Ag (PLA-Ag) (n = 4).

Перед операцией осуществлялась подготовка операционного поля (депиляцию волосяного покрова в области черепа). В операционных условиях, под тотальным внутривенным наркозом и местной анестезией, были выполнены поперечный и вертикальный латерально-смещённый разрезы кожи головы, с формированием треугольного лоскута, после чего скелетирована поверхность теменной кости. В проекции сагиттального шва на теменной кости формировали круглое отверстие с помощью трепана C-reamer из набора Neobiotech SLA (Корея), диаметр 8 мм и высотой 1,5 мм, избегая перфорации сагиттального венозного синуса. Рану послойно ушивали. Гемостаз по ходу операции.

Мембраны PLA и PLA-Ag устанавливали в область критического костного дефекта. Область имплантации ушивали резорбируемой полимерной нитью. Крови в ходе операции было небольшое количество. Животные были выведены из наркоза и оставлены под наблюдение. Согласно срокам наблюдения, соответственно протоколу на 14, 28, 42 сутки животных выводили из эксперимента и проводили биопсию ранее прооперированной области (8 животных выводились через 14 дней; 8 – через 28 дней; 8 – через 42 дня).

В контрольной группе кроликам внутримышечно вводили пенициллин (2,5 мл. 7 дней). Выведение животных из эксперимента проводили каждые 14 дней по 4 животных. Была произведена трепанация черепа, послеоперационный участок (мягкие ткани и затылочная кость черепа 2 x 1,5 см.) изъят и отправлен на гистологическое и иммуногистохимическое исследование.

2.5. Лабораторные методы исследования

Изучение аутопсийного материала проводили в патологоанатомическом отделении, где его подвергали гистологическому, гистохимическому и иммуногистохимическому (ИГХ) исследованиям с проведением компьютерной морфометрии.

Морфологический анализ. Фиксация аутопатов производилась в 10% формалине по Лилли (рН=7,2; от 5 до 24 часов) забуференном HCl; дегидратация проводилась в батарее спиртов восходящей концентрации в аппарате гистологической проводки тканей фирмы «Leica Biosystems» (Германия) и заливая в парафин. Ткани срезом толщиной ≈ 4 мкм, для проведения биопсии помещали на обычные предметные стёкла, а для иммуногистохимического исследования (ИГХ) – на специальные адгезивные предметные стёкла Super Frost Plus («Mainzel Glaser», Polylysine, Германия), согласно принятой стандартной методике, производилась депарафинизация. В дальнейшем срезы либо окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для гистологического исследования, либо использовали для ИГХ.

Гистологическое исследование образцов ткани выполнялось сразу после проведения биопсии. Полученный материал был помещен в 10% раствор формалина в фосфатном буфере на 72 часа, затем в течение суток образцы ткани промывали в проточной воде. Декальцинацию осуществляли в перенасыщенном растворе этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) с добавлением NaCl (9 г/л) электролитическим способом. Затем после стандартной парафинизации из кусочков изготавливались парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм и окрашивались гематоксилином и эозином. После окраски препараты высушивали в течение 2 недель при комнатной температуре, заключая в монтирующую среду. Изучение данных срезов тканей проводили методом обзорной окраски гематоксилином и эозином по Бокку, Майеру; а также препараты окрашивали по Массон-Голднер (BioOptica, Italy) для выявления специфических процессов образования костной ткани и резорбции.

Приготовление недекальцинированных срезов. Образцы, фиксированные в 4% нейтральном формалине (Биооптика, Италия), промывали, обезвоживали и заливали в метилметакрилат по оригинальной методике. Из блоков, полученных ранее, изготавливались первичные срезы 200 мкм (Lowspeed saw Jet, Швейцария), а затем готовились вторичные срезы толщиной мкм. Контроль за толщиной среза осуществлялся механическим микрометром барабанного типа. Срезы окрашивались по оригинальной методике толуидиновым синим и заключались в монтирующую среду (Биооптика, Италия).

Документирование всех изображений проводилось на микроскопе Leica DM2500 с фотокамерой Leica DTC295. Схема метода рандомизации заключалась в использовании генератора случайных чисел Random, определялись 5-7 номеров стекол (например, 12, 18, 22, 25, 38 из 50 стекол в серии), если не было необходимости в прицельном изучении объекта. Изучению и документированию подвергался каждый 3 срез, если качество было не удовлетворительное, то исследовался последующий и так далее.

Иммуногистохимический анализ. В след за депарафинизацией и регидратацией парафиновых срезов, по стандартному протоколу проводили ИГХ-исследование в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Германия).

В качестве первичных антител использовали мультипротеиновый комплекс на поверхности Т-лимфоцитов (антитела к CD3 в готовом разведении), являющийся основным корцептором Т-клеточного рецептора. В его функции входит передача сигналов в клетку, а также стабилизация Т-клеточного рецептора на поверхности мембраны. Один из белков кластера дифференцировки. Образован четырьмя субъединицами у млекопитающих: CD3 γ , CD3 δ и двумя CD3 ϵ .

CD15 – иммунологически важная молекула, производное дисахарида, углеводная молекула адгезии, которая может быть компонентом гликопротеинов, гликолипидов и протеогликанов. CD15 является углеводом, в отличие от большинства молекул, относящихся к кластерам дифференцировки, которые являются белками.

CD30 – протеин из семейства рецепторов для факторов некроза опухоли. Протеин клеточной мембраны. Представляется в двух формах — мембранно-связанной, когда молекула фиксирована на поверхности клетки и растворимой – soluble CD30 (sCD30), секретируемой активированным лимфоцитом. Первая появляется на поверхности активированных Т и В клеток, приводит к активации NF- κ B при её взаимодействии с сигнальными белками TRAF2 и TRAF5

CD68 – универсальные, вторичные антитела.

С целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов, выполняли контрольные исследования для каждого маркера. Все срезы были докрашены гематоксилином Майера, промыты под проточной водой, дегидратированы и заключены в бальзам.

На светоптическом микроскопе «Carl Zeiss Lab.A1» (Carl Zeiss, Германия), совмещённом с видеокамерой «AxioCam ERc5s» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и программным обеспечением ZEN Lite осуществляли визуализацию материала. Затем в % в десяти полях зрения подсчитывали долю иммунопозитивных клеток при увелич. $\times 400$: «-» – отсутствие, «+» – слабая (1–10% клеток), «++» – умеренная (11–50% клеток), «+++» – выраженная ($\geq 51\%$ клеток) реакция.

2.6. Методы статистического анализа полученных результатов

Данные эксперимента обрабатывали с помощью программы SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). Были определены вариационные ряды, среднеквадратические, среднеарифметические отклонения, средняя ошибка и вероятность различий. Проведена оценка нормальному распределению Колмогорова–Смирнова (соответствие и несоответствие результатов). В случае отсутствия нормального распределения использовали непараметрический критерий F. Wilcoxon с уровнем значимости $p < 0.05$.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОРЕЗОРБИРУЕМОЙ МЕМБРАНЫ НА ПОЛИМЕРНОЙ ОСНОВЕ, СОДЕРЖАЩЕЙ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА

3.1. Получение раствора гидрозоля со стабилизированными наночастицами серебра

Гидрозоли металлов – это водные растворы их наночастиц. Получение гидрозоля наночастиц серебра Ag в виде препарата «НанАргол» осуществляли на специально сконструированной установке.

Препарат «НанАргол» представляет собой раствор безионного коллоидного серебра. Номер свидетельства: RU.77.99.11.003. E.001609.03.13. Дата регистрации и переоформления: 01.03.2013. Декларация о соответствии: ТС RU Д-RU.ПК04. В.00234.

Состав: коллоидное наносеребро – 0,2 мг/мл, измеренное при температуре $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, вода, натрий лимоннокислый.

Свойства: препарат обладает пролонгированным бактерицидным эффектом в отношении штаммов микрофлоры наддесневого и поддесневого зубного налета, преимущественно – анаэробным [63].

В работе использовали водные и водные диализованные дисперсии наночастиц серебра, производства ООО НПК «Наномет» (Москва).

Определение размера наночастиц серебра проводили методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) на приборах Coulter N4 MD (Coulter Electronics, США) и Horiba LB 550 (Horiba, Япония).

Микрофотографии наночастиц получали методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) с помощью микроскопа LEO912 AB OMEGA (Carl Zeiss, Германия).

Нанесение гидрозоля наночастиц серебра Ag на мембрану было основано на пропитке мембраны PLA методом погружения до состояния полного впитывания и

кратковременного нахождения её до момента применения по назначению в концентрированном растворе гидрозоля серебра препарата «НанАргол».

Стабилизация наночастиц серебра в гидрозоле происходит за счет образования вокруг них гидратных оболочек диполей воды. Дополнительно устойчивость нанодисперсной системы обеспечивается образованием адсорбционных слоев цитрат – анионов вокруг частиц дисперсной фазы. В результате этого получаемая гидрозоль при соблюдении условий хранения является устойчивой в течение двух лет. Массовая концентрация наночастиц серебра (антибактериального компонента) в гидрозоле «НанАргол», согласно ТУ, составляет 0,2 мг/мл, измеренного при температуре $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ с помощью атомно-эмиссионного спектрометра iCAP 6300 Radial View.

Основной интервал размеров наночастиц серебра в гидрозоле варьирует в интервале от 0,5 нм до 3 нм. Из электронограммы на Рисунке 3.1 следует, что расположение колец соответствует дисперсной фазе серебра.

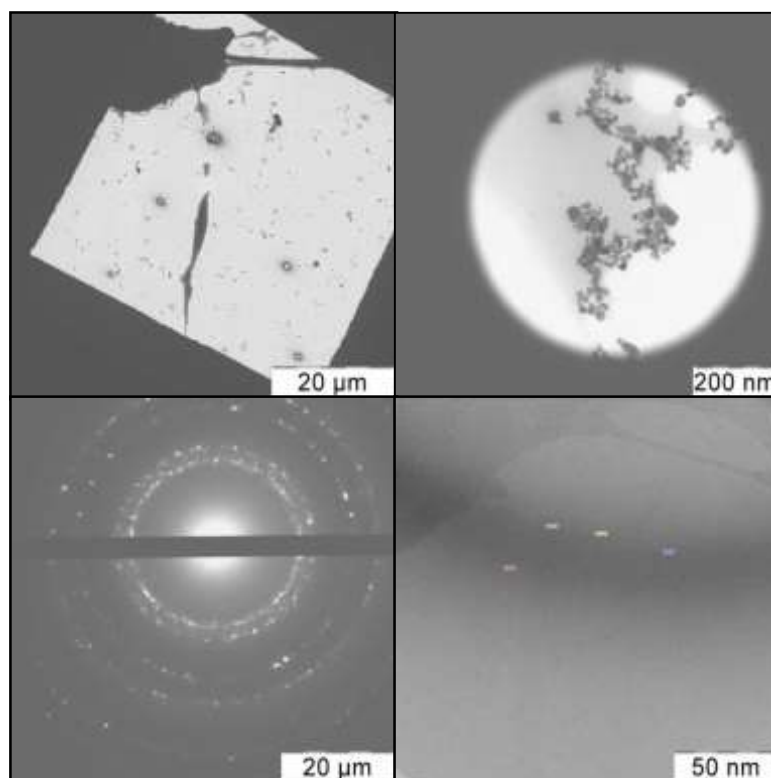


Рисунок 3.1 – Микрофотографии наночастиц серебра в гидрозоле, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа LEO 912 AB OMEGA с энергетическим фильтром и системой Келлера

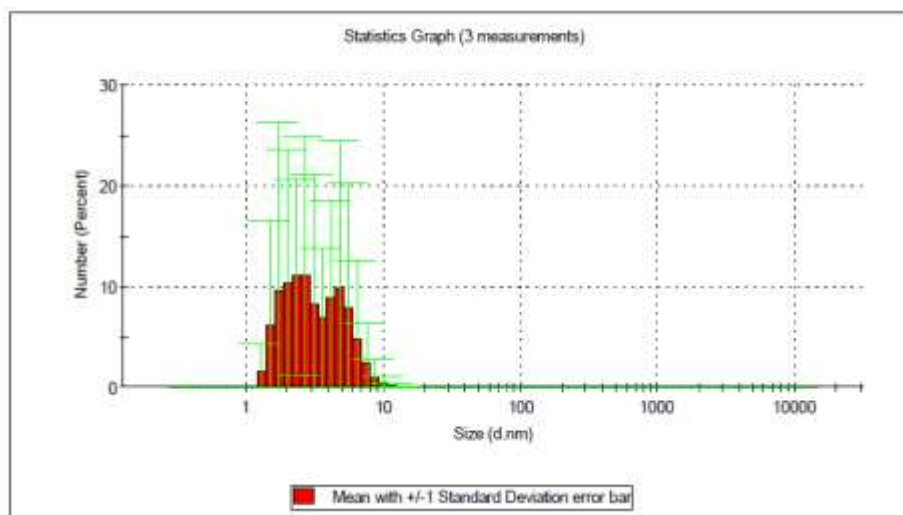


Рисунок 3.2 – Распределение агрегатов наночастиц серебра в гидрозоле по данным изменения на двухугловом анализаторе размеров частиц и молекул Malvern Zetasizer Nano ZS

Results

| | Mean (mV) | Area (%) | St Dev (mV) |
|-------------------------------------|----------------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): -19.2 | Peak 1: -19.2 | 100.0 | 8.31 |
| Zeta Deviation (mV): 8.31 | Peak 2: 0.00 | 0.0 | 0.00 |
| Conductivity (mS/cm): 0.0152 | Peak 3: 0.00 | 0.0 | 0.00 |
| Result quality Good | | | |

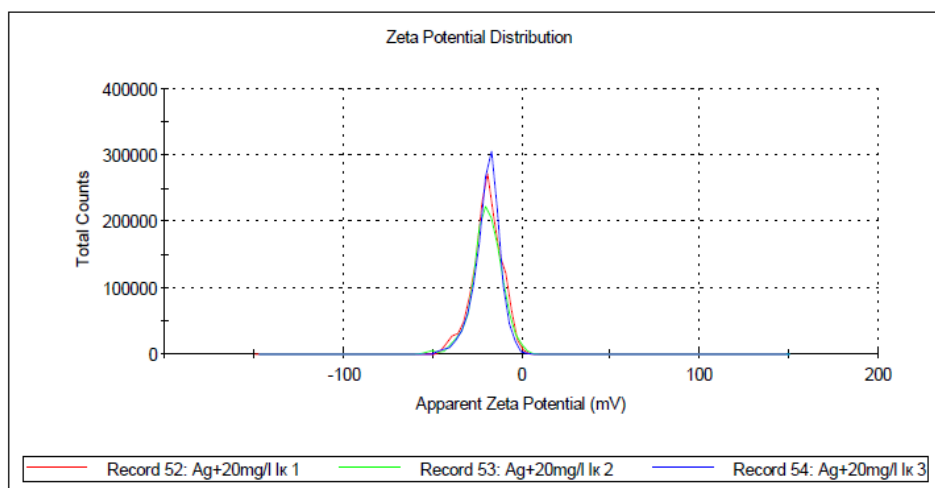


Рисунок 3.3 – Величина дзета-потенциала агрегатов наночастиц серебра в дисперсной системе «НанАргол», полученная с помощью двухуглового анализатора размеров частиц и молекул Malvern Zetasizer Nano ZS

Из сравнительного анализа Рисунков 3.2 и 3.3 можно сделать вывод, что при массовой концентрации дисперсной фазы серебра 0,2 мг/мл в гидрозоле основное количество наночастиц серебра находится в неагрегированном состоянии, что

является важным условием высокой бактерицидности и устойчивости коллоидного раствора.

Высокая фазовая устойчивость используемой дисперсной системы подтверждена значением величины дзета-потенциала наночастиц серебра – 19,2 мВ (Рисунок 3.3). Результаты измерения величины дзета-потенциала наночастиц серебра – 19,2 мВ свидетельствуют о высокой фазовой устойчивости дисперсной системы.

3.2. Исследование токсичности гидрозоля наночастиц серебра

Оценку острой токсичности коллоидного раствора наночастиц серебра проводили по показателям смертности дафний (*D. magna* Straus). Контролем служили растворы без наночастиц серебра. Критерием острого токсического действия являлась гибель более 50 % особей в течение 48 часов.

Для исследования использовали концентрации гидрозоля наночастиц серебра: 0,001; 0,002; 0,02; 0,2; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 мг/мл. Тестирование проводили в биологических пробирках (100 см³) с 50 см³ воды, содержащей растворы наночастиц серебра. В каждую пробирку помещали по 10 дафний (возраст 6–24 ч.). Учет смертности дафний проводили каждые 24 часа. Эксперимент прекращали, если во всех опытных пробирках в течение 24 часов наблюдалась гибель более 50 % рачков. Через 48 часов подсчитывали количество выживших и погибших дафний и рассчитывали процент погибших особей.

В результате проведенных исследований было установлено, что различные концентрации коллоидного раствора наночастиц серебра характеризовались различным уровнем токсичности в отношении тест-объектов (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Гибель *Daphnia magna* Straus в зависимости от концентрации наночастицы серебра (экспозиция 48 ч)

| Концентрация НЧ Ag, мг/л | Показатель гибели дафний (<i>D. magna</i> Straus), % | | | Хср | Выживаемость дафний (<i>D. magna</i> Straus), % |
|-----------------------------|--|---------------|---------------|-----|---|
| | 1 повторность | 2 повторность | 3 повторность | | |
| 0 (контроль) | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 0,002 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 1,0 | 20 | 20 | 20 | 20 | 80 |
| 2,0 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 5,0 | 80 | 80 | 80 | 80 | 20 |
| 10,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 |
| 20,0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 |

Наиболее безопасной для дафний (*D. magna* Straus) явилась концентрация гидрозоля наночастиц серебра в диапазоне 0,001–1,0 мг/л. В данных вариантах опытов гибель рачков не отмечалась, либо была менее 50%. Концентрация наночастиц серебра 0,2 мг/мл (для пропитки мембраны методом погружения) входила в нетоксичный диапазон концентраций, установленный с помощью *Daphnia magna* Straus.

Таким образом, согласно показателям выживаемости дафний, было установлено, что гидрозоль наночастиц серебра с концентрацией 0,2 мг/мл является нетоксичным для изучаемого тест-объекта *Daphnia magna* Straus. Выживаемость дафний *Daphnia magna* Straus составила 100%.

3.3. Методика нанесения наночастиц серебра на полимерную мембрану

3.3.1. Разработка методики нанесения наночастиц серебра на полимерную мембрану

Целью модификации остеопластической мембраны PLA являлось придание ей определенных бактерицидных и бактериостатических свойств в отношении

патогенной микрофлоры, развивающейся в местах повреждения костной и соединительной тканей человека.

Методика модификации была основана на пропитке мембраны PLA методом погружения до состояния полного впитывания и кратковременного нахождения её до момента применения по назначению в концентрированном растворе гидрозоля серебра препарата «НанАргол».

В результате капиллярного впитывания раствора в пористую структуру и адсорбции высокоэнергетических наночастиц серебра на поверхности полимерных волокон в местах контакта мембраны с тканями человека формируется поверхностная и объемная антимикробная зона, препятствующая появлению и развитию нежелательной микробиоты и, одновременно, способствующая заживлению повреждений.

На Рисунке 3.4 изображена микроструктура мембраны PLA, которая представлена хаотичным переплетением различных волокон, полученных нетканым способом.

На Рисунках 3.5–3.7 представлен участок мембраны PLA, с которого был взят элементный анализ и с помощью энергодисперсионной спектроскопии получены соответствующие карты. Из Рисунков 3.6 и 3.7 видно, что основными химическими элементами, из которых состоят волокна, являются углерод и кислород, что полностью соответствует химическому составу волокон.

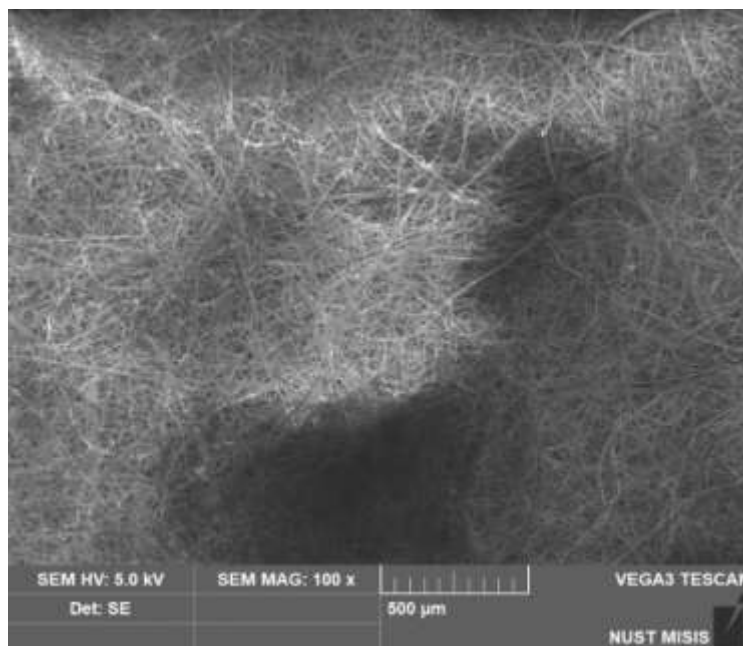


Рисунок 3.4 – Микрофотография мембраны PLA без обработки гидрозоле́м наночастиц серебра, полученная с помощью растрового электронного микроскопа «Tescan» «Vega 3SB»

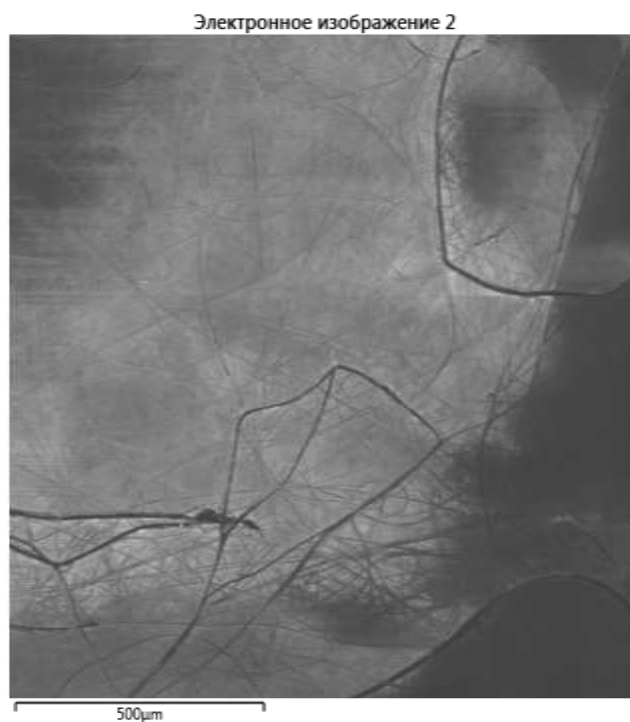


Рисунок 3.5 – Микрофотография участка мембраны PLA, взятого для элементного анализа, полученная с помощью растрового электронного микроскопа «Tescan» «Vega 3SB» с энергодисперсионным анализатором «10mm² SDD Detector - X-Act»

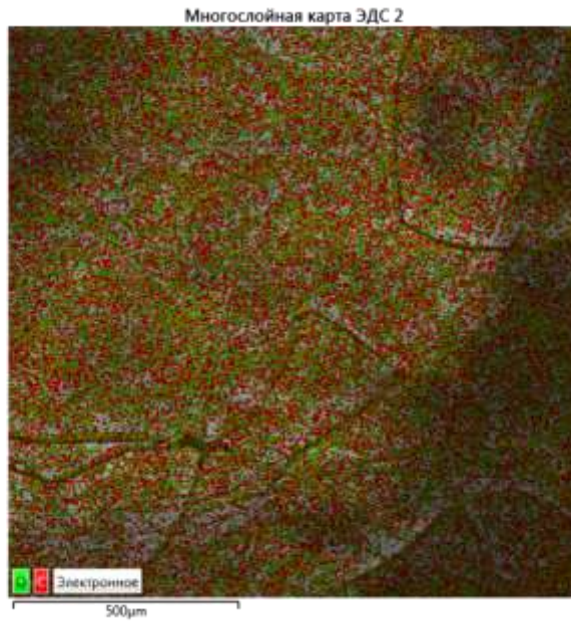


Рисунок 3.6 – Суммарный элементный анализ участка мембраны PLA, установленный с помощью растрового электронного микроскопа «Tescan» «Vega 3SB» с энергодисперсионным анализатором «10mm² SDD Detector - X-Act»

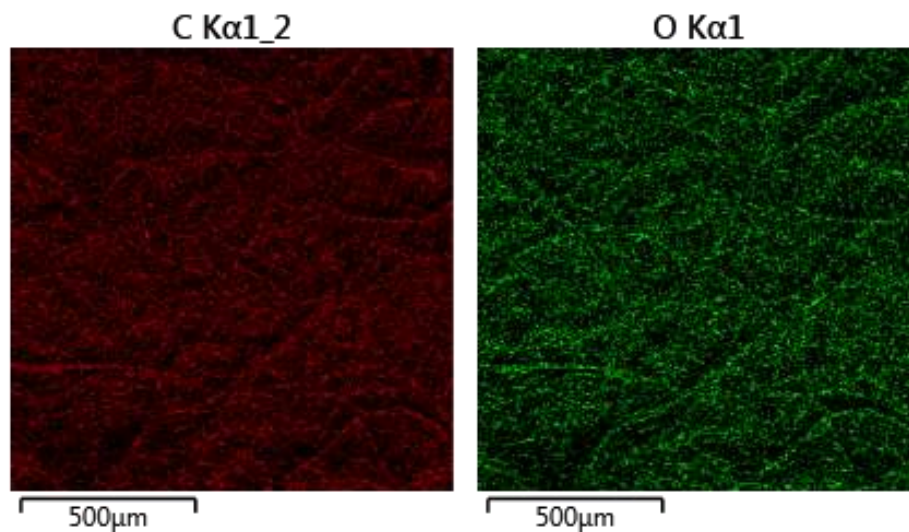


Рисунок 3.7 – Анализ по химическим элементам участка мембраны PLA, установленный с помощью растрового электронного микроскопа «Tescan» «Vega 3SB» с энергодисперсионным анализатором «10mm² SDD Detector - X-Act»

На Рисунках 3.5–3.7 представлен участок мембраны PLA, с которого был взят элементный анализ и с помощью энергодисперсионной спектрометрии получены соответствующие карты. Из Рисунков 3.6–3.7 видно, что основными химическими элементами, из которых состоят волокна, являются углерод и кислород, что полностью соответствует химическому составу волокон.

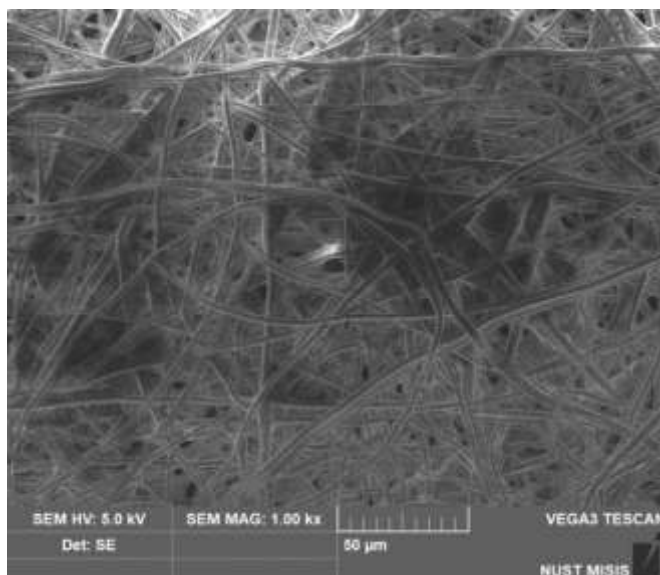


Рисунок 3.8 – Микрофотография мембраны PLA после обработки гидрозолем «НанАргол» (PLA-Ag), полученная с помощью растрового электронного микроскопа «Tescan» «Vega 3SB»

Из Рисунка 3.8 видно, что после обработки мембраны гидрозолем наночастиц серебра (PLA-Ag) на поверхности волокон наблюдается «белое» свечение, которое является отличительной особенностью от микрофотографии мембраны без обработки гидрозолем серебра.

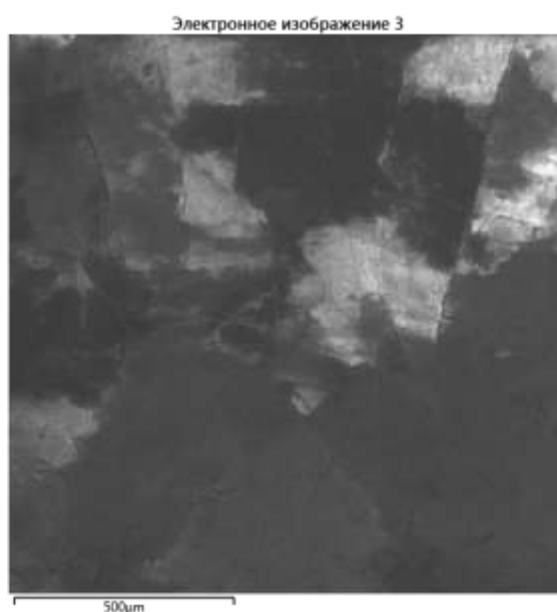


Рисунок 3.9 – Микрофотография участка мембраны PLA, обработанного гидрозолем «НанАргол» (мембрана PLA-Ag) и взятого для элементного анализа, полученная с помощью растрового электронного микроскопа «Tescan» «Vega 3SB» с энергодисперсионным анализатором «10mm² SDD Detector - X-Act»

Элементный анализ, полученный с участка мембраны PLA-Ag (Рисунок 3.9) методом энергодисперсионной спектроскопии, показывает помимо углерода и кислорода наличие серебра (Рисунок 3.10, Рисунок 3.11).

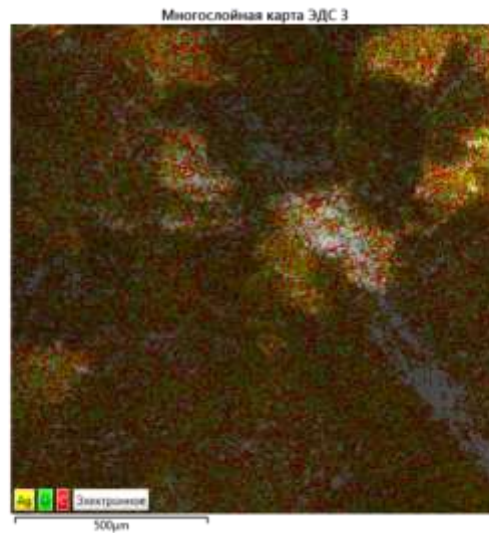


Рисунок 3.10 – Суммарный элементный анализ участка мембраны, обработанный гидрозолеом «НанАргол» (PLA-Ag) и установленный с помощью растрового электронного микроскопа «Тескан» «Vega 3SB» с энергодисперсионным анализатором «10mm2 SDD Detector - X-Act»

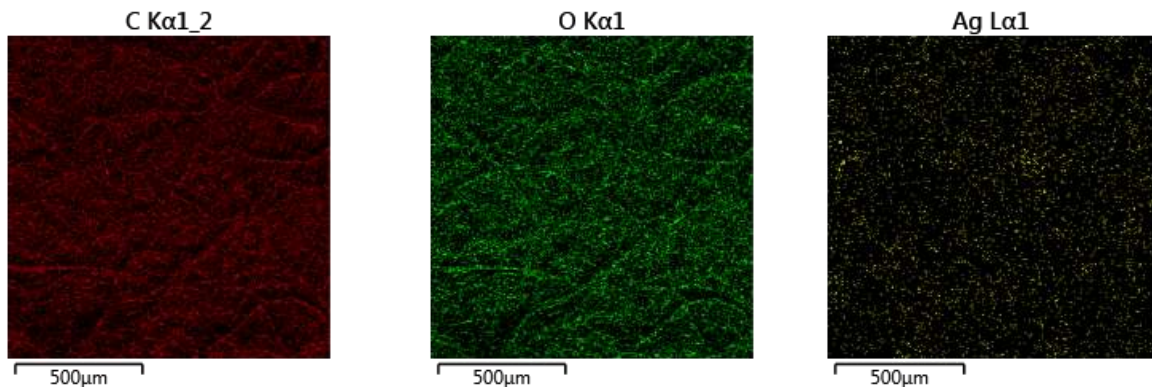


Рисунок 3.11 – Анализ по химическим элементам участка мембраны, обработанного гидрозолеом «НанАргол» (PLA-Ag) и установленный с помощью растрового электронного микроскопа «Тескан» «Vega 3SB» с энергодисперсионным анализатором «10mm2 SDD Detector - X-Act»

Данный факт полностью подтверждает адсорбцию наночастиц серебра на поверхности волокон мембраны. Более того, из Рисунка 3.11 видно, что агрегаты наночастиц серебра равномерно распределены по всему объему мембраны PLA-Ag,

что, в свою очередь, обеспечит равномерное проявление длительных антибактериальных свойств по патогенной микрофлоре зубной полости.

3.3.2. Исследование скорости деградации мембран в физиологическом растворе

С целью анализа взаимодействия наноконпонентного имплантата со средой живого организма было проведено исследование скорости деградации образцов мембран в физиологическом водном 0,9 мас. % растворе NaCl, имитирующем свойства сыворотки крови. Исследование проводили на мембране из полилактид-фиброина, модифицированной наночастицами серебра PLA-Ag и исходной мембране без наночастиц серебра PLA. Для сравнения использовали образец мембраны «Биопласт-Дент».

Рассчитана разница в массе образцов до и после начала эксперимента, получены процентные отношения потери массы, а также оценен рост и снижение массы образцов во время их пребывания в растворе NaCl (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Масса смоченных образцов мембран в различные сроки эксперимента, мг

| Показатель | № образца | | | | | | |
|--|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2* | 3 | 4 | 5* | 6 | |
| Масса сухого образца, мг | 0,139 | 0,178 | 0,135 | 0,171 | 0,144 | 0,138 | |
| Масса смоченного образца, мг | 0,230 | 0,264 | 0,228 | 0,213 | 0,186 | 0,262 | |
| Масса смоченного образца через | 1 ч | 0,178 | 0,247 | 0,165 | 0,192 | 0,182 | 0,160 |
| | 3 ч | 0,178 | 0,235 | 0,158 | 0,201 | 0,177 | 0,164 |
| | 1 день | 0,178 | 0,244 | 0,161 | 0,201 | 0,177 | 0,166 |
| | 3 дня | 0,178 | 0,24 | 0,163 | 0,201 | 0,182 | 0,165 |
| | 5 дней | 0,159 | 0,217 | 0,133 | 0,166 | 0,157 | 0,151 |
| | 7 дней | 0,172 | 0,238 | 0,165 | 0,20 | 0,176 | 0,168 |
| Масса высушенного образца после окончания эксперимента, мг | 0,114 | 0,136 | 0,101 | 0,132 | 0,116 | 0,112 | |
| Потеря массы образца, мг | 0,025 | 0,042 | 0,034 | 0,039 | 0,028 | 0,026 | |
| Потеря массы образца, % | 17,9 | 23,6 | 25,18 | 22,8 | 19,44 | 18,84 | |
| t; p | t=0,22; p>0,05 | | | | | | |
| Размещение образцов исследуемых мембран в лунках культурального планшета: №№1,4 - мембраны из «полилактид-фиброина» PLA; №№ 2,5 - мембраны из «полилактид-фиброина» с наночастицами серебра PLA-Ag; №№ 5,3 - «Биопласт-Дент». | | | | | | | |

Масса сухих образцов заметно увеличивалась после смачивания, что может объясняться их большой пористостью. Во время проведения эксперимента массу образцов измеряли в следующие периоды времени: 1 ч, 3 ч, 1 день, 3 дня, 5 и 7 дней. Затем образцы извлекали из раствора и высушивали при комнатной температуре. Изменения массы образцов и масса высушенных образцов по окончании эксперимента была значительно ниже массы образцов до их осушки (Таблица 3.2). При этом потеря массы во всех образцах мембран составила менее 1/4 их общей массы. Это говорит о том, что образец исследуемой мембраны из «полилактид-фиброина», модифицированной наночастицами серебра PLA-FR–Ag сохраняет свои свойства через 7 дней нахождения в физиологическом растворе, что делает ее пригодной для использования в целях тканевой инженерии.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана методика нанесения гидрозоля наночастиц Ag на мембрану из полилактида и фиброина шелка. Методика основана на кратковременном погружении мембраны в раствор гидрозоля «НанАргол» с концентрацией наночастиц Ag 0,2 мг/мл непосредственно перед ее использованием до состояния полного впитывания. Капиллярное впитывание и адсорбция наночастиц серебра в пористую волокнистую структуру мембраны при контакте с поврежденными тканями позволит сформировать объемную антимикробную зону, препятствующую появлению и развитию нежелательной микрофлоры и, одновременно, способствующую заживлению повреждений зубной полости.

Исследование скорости деградации образцов мембраны показало сохранность ее в физиологическом водном 0,9 мас. % растворе NaCl, имитирующем свойства сыворотки крови.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСОВМЕСТИМОСТИ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕМБРАН С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

4.1. Исследование токсичности и биосовместимости *in vitro*

4.1.1. Исследование цитотоксичности мембран на культурах клеток нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов

Биологические испытания *in vitro* включали изучение 24-часовой цитотоксичности образцов мембраны, модифицированной наночастицами Ag (PLA-Ag) на культурах клеток нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов, обладающих способностью интернализировать наноматериалы. Нейтрофильные гранулоциты отличаются способностью поглощения веществ субмикронных размеров, представляя собою основную систему клиренса в кровотоке. «Мононуклеарные лейкоциты крови принимают активное участие в реакциях приживления и (или) отторжения имплантатов» [146].

В экспериментах *in vitro* проводили исследование мембраны, модифицированной наночастицами серебра PLA-Ag в сравнении с исходной мембраной PLA (без нанесения наночастиц серебра). Образцы мембран 1×1 см в виде пленок толщиной 0,2–0,23 мм перед биологическими испытаниями автоклавировали в течение 30 мин при 121°С и 1 атм. Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью их окраски остморральными красителями [77]. Число живых клеток к началу эксперимента составляло 98–99%.

Согласно полученным данным, доля жизнеспособных мононуклеарных лейкоцитов при добавлении к клеточной суспензии тестируемых образцов PLA и PLA-Ag составила 97% ($p < 0,05$), что статистически значимо не отличалось от показателя в контрольной культуре клеток (98%), не контактировавших с искусственными пластическими материалами (Рисунок 4.1).

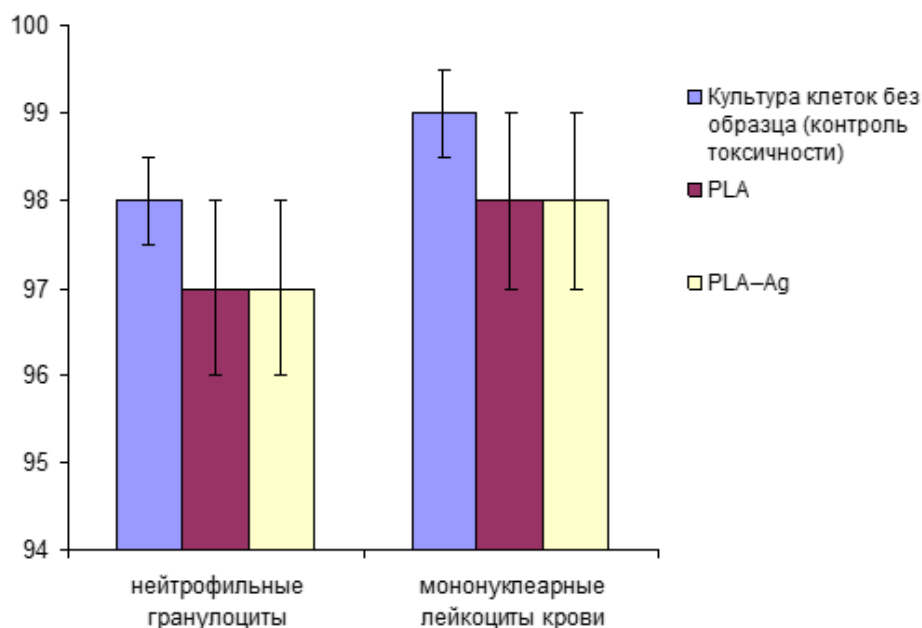


Рисунок 4.1 – Жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов и моноклеарных лейкоцитов при сокультивировании с образцами мембран PLA и PLA-Ag. Различия между группами сравнения недостоверны

Результаты оценки жизнеспособности нейтрофильных гранулоцитов показали схожие значения для мембран PLA и PLA-Ag: на уровне 97–98% ($p < 0,05$), что также статистически значимо не отличалось от показателя в контрольной культуре клеток (99%). В присутствии всех исследуемых образцов количество жизнеспособных клеток уменьшалось незначительно, что может свидетельствовать об отсутствии их цитотоксичности.

Таким образом, в результате экспериментальных исследований *in vitro* подтверждено отсутствие цитотоксичности полилактидной мембраны, модифицированной наночастицами серебра PLA-Ag в отношении клеток нейтрофильных гранулоцитов и моноклеарных лейкоцитов.

4.1.2. Исследование индекса выживаемости лейкоцитов крови человека

Результаты подсчета лейкоцитов в крови после контакта с образцом мембран и расчет индекса выживаемости лейкоцитов представлен в Таблице 4.1. При этом

в группах образцов мембран получены сравнимые, не отличающиеся друг от друга, весьма благоприятные показатели ($p>0,05$).

Таблица 4.1 – Результаты расчета индекса выживаемости лейкоцитов крови человека после контакта с образцами мембран. Различия между группами сравнения недостоверны

| Образец мембраны | Количество лейкоцитов, $10^9/\text{л}$ | Среднее значение, $10^9/\text{л}$ | Индекс выживаемости лейкоцитов, % | t; p |
|------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| PLA | 1.1 | 2,5 | 101,1 | t=0,36; p>0,05 |
| | 1.2 | 2,0 | | |
| | 1.3 | 4,0 | | |
| | 1.4 | 2,5 | | |
| | 1.5 | 2,5 | | |
| | 1.6 | 3,0 | | |
| PLA-Ag | 2.1 | 2,5 | 104,04 | t=0,36; p>0,05 |
| | 2.2 | 2,0 | | |
| | 2.3 | 4,0 | | |
| | 2.4 | 3,0 | | |
| | 2.5 | 2,5 | | |
| | 2.6 | 3,0 | | |
| Контроль (кровь без образца) | 3.1 | 2,5 | 100 | t1=0,507; p1>0,05; t2=0,507; p2>0,05 |
| | 3.2 | 3,0 | | |
| | 3.3 | 2,8 | | |
| | 3.4 | 2,5 | | |
| | 3.5 | 2,5 | | |
| | 3.6 | 3,0 | | |

Согласно полученным данным индекс выживаемости лейкоцитов для испытываемых образцов мембраны «полилактид-фиброин» PLA и мембраны, модифицированной наночастицами серебра PLA-Ag составил соответственно 101,1% и 104,04%. Незначительное увеличение выживаемости лейкоцитов на 1,1% и 4,04% от контроля (кровь без образца), могут быть связаны с погрешностями проведения эксперимента. Различия между группами образцов оказались достоверно статистически незначимыми ($t=0,36$; $p>0,05$). При этом различия образцов с контролем было недостоверным ($t_1=0,507$; $p_1>0,05$; $t_2=0,507$; $p_2>0,05$). Несмотря на увеличение показателя выживаемости лейкоцитов с образцами мембран, значимого различия с контрольным индексом определить не удалось ($p>0,05$).

В результате проведения исследований установлено отсутствие негативного влияния имплантационного материала на клетки крови – лейкоциты. Данные клетки выполняют жизненно важные функции в организме человека: защитную, регенеративную и регуляторную. При сильном снижении количества лейкоцитов в крови наблюдается лейкопения, при увеличении – лейкоцитоз. Лейкоцитозы имеют физиологическую и патологическую форму; лейкопения вызывается только при патологии. Лейкопения может проявляться как результат действия лечебных препаратов или при отравлении химическими средствами. Заболевание ведет к постепенному ослаблению и истощению организма, повышению температуры, ознобу, учащению сердцебиения, головным болям и т. д. На фоне данных процессов бурно развиваются инфекции. Патологический лейкоцитоз вызывается в основном инфекциями и воспалительными заболеваниями. Вследствие этого важно контролировать нормальный уровень лейкоцитов в крови, в особенности при имплантации чужеродного материала.

В результате проведенного эксперимента показано, что при взаимодействии мембраны на основе «полилактид-фиброина» с наночастицами Ag (PLA-Ag) и без наночастиц (PLA) с сывороткой крови наблюдается незначительное увеличение индекса выживаемости лейкоцитов в сравнении с контролем: на 1,1% и 4,04% соответственно. Эти показатели не являются отклонениями от нормы и могут быть связаны с погрешностями эксперимента.

В связи с этим можно сделать вывод об отсутствии патологического лейкоцитоза и лейкопении в сыворотке крови, взаимодействующей с материалом мембраны «полилактид-фиброин» PLA и мембраны, модифицированной наночастицами серебра PLA-Ag.

4.1.3. Исследование антимикробной активности мембран *in vitro*

Нами в условиях *in vitro* исследована антимикробная активность разработанной мембраны «полилактид-фиброин», модифицированной наночастицами серебра PLA-FR-Ag в отношении клинических штаммов

Streptococcus pyogenes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с инфекционными осложнениями после установки стоматологических имплантатов.

В основной группе использовали мембрану PLA-Ag, модифицированную наночастицами Ag. В контрольной группе – исходную мембрану PLA (без наночастиц Ag).

Тестирование *in vitro* мембраны PLA-Ag показало максимально высокую эффективность наночастиц серебра в отношении грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* (100%). В отношении бета-гемолитических стрептококков *Streptococcus pyogenes* 50% (3/6) и грамотрицательных палочковидных бактерий *Escherichia coli* – 33% (2/6) наночастицы серебра показали удовлетворительную активность. В вариантах контрольных образцов наблюдался сплошной рост микроорганизмов (Таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Результаты инкубации мембран с патогенными штаммами микроорганизмов *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Различия между группами сравнения недостоверны

| | Штаммы | PLA-FR-Ag | PLA-FR контроль 1 | Без образца контроль 2 |
|---|--------------------------------------|-----------|----------------------|---------------------------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | |
| 1 | <i>Staphylococcus aureus</i> Ф0005 | - | +++ | +++ |
| 2 | <i>Staphylococcus aureus</i> Ф0223 | - | +++ | +++ |
| 3 | <i>Staphylococcus aureus</i> Ф0248 | - | +++ | +++ |
| 4 | <i>Staphylococcus aureus</i> Ф0322 | + | +++ | +++ |
| 5 | <i>Staphylococcus aureus</i> Ф0396 | - | +++ | +++ |
| 6 | <i>Staphylococcus aureus</i> Ф0412 | + | +++ | +++ |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> | | | |
| 1 | <i>Streptococcus pyogenes</i> Ф0188 | - | +++ | +++ |
| 2 | <i>Streptococcus pyogenes</i> Ф0387 | ++ | +++ | +++ |
| 3 | <i>Streptococcus pyogenes</i> Ф0392 | - | +++ | +++ |
| 4 | <i>Streptococcus pyogenes</i> Ф0402 | - | +++ | +++ |
| 5 | <i>Streptococcus pyogenes</i> Ф0404 | + | +++ | +++ |
| 6 | <i>Streptococcus pyogenes</i> Ф0422 | ++ | +++ | +++ |

Продолжение Таблицы 4.2

| | <i>Escherichia coli</i> | | | |
|---|--------------------------------|----|-----|-----|
| 1 | <i>Escherichia coli</i> Ф0030 | + | +++ | +++ |
| 2 | <i>Escherichia coli</i> Ф0036 | ++ | +++ | +++ |
| 3 | <i>Escherichia coli</i> Ф0068 | - | +++ | +++ |
| 4 | <i>Escherichia coli</i> Ф0093 | + | +++ | +++ |
| 5 | <i>Escherichia coli</i> Ф00211 | ++ | +++ | +++ |
| 6 | <i>Escherichia coli</i> Ф00286 | - | +++ | +++ |

Примечание: сплошной рост «+++»; скудный рост «++»; единичные колонии «+»; отсутствие роста «-»

Антибактериальный эффект ионов серебра зависит от степени поражения клетки. Изначально оболочка клетки, которая выполняет защитную функцию, поглощает серебро. При этом клетка сохраняет свою жизнеспособность, но происходит нарушение некоторых функций, к примеру, митотическая активность. После попадания наночастиц серебра внутрь клетки, возникает подавление ферментов дыхательной цепи, что приводит к разобщению процесса дыхания и окислительного фосфорилирования, а по итогу и к гибели микробных клеток (бактерицидный эффект)».

Что касается антибактериального воздействия серебра на микроорганизмы доказано, что данный металл дезактивирует белки клеточной стенки связываясь с серосодержащими соединениями. Помимо того, одним из основных антибактериальных механизмов ионов серебра является взаимодействие с рибосомой и последующим подавлением экспрессии белков, нужных для производства АТФ.

Обобщая механизмы бактерицидной активности наноструктур металлов, выделяя основные:

– изменение проницаемости бактериальной мембраны с постепенным освобождением липополисахаридов и внутриклеточных факторов за счет накопления наночастиц металлов и освобождение их ионов;

- нарушение синтеза ДНК и внутриклеточного производства АТФ, за счет поглощения, перемещения и усвоения наночастиц и ионов металлов клеткой;
- окислительное повреждение структур клеток посредством производства активных форм кислорода при участии частиц ионов серебра.

Данные результаты говорят о том, что наночастицы серебра входящие в состав мембраны PLA-Ag, обладают антибактериальной активностью в отношении клинических штаммов *S. Aureus*, *S. pyogene* и *E. coli*. И дают сделать вывод, что нанесение наночастиц серебра, обладающих направленным антимикробным действием, на поверхность барьерных биорезорбируемых мембран, используемых для возмещения костных дефектов альвеолярной части челюстей, позволяет добиться антибактериального эффекта.

4.1.4. Исследование цитокондуктивности и биосовместимости мембран

Цитокондуктивность материала определяется способностью биологических клеток колонизироваться на его поверхности. Для исследования цитокондуктивности материала образцов мембран была исследована пролиферативная активность клеток соединительной ткани – фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ) на их поверхности.

В экспериментах *in vitro* проводили исследование мембраны из полилактида с покрытием наночастицами серебра PLA-Ag. В контрольной группе использовали эту же мембрану без нанесения наночастиц серебра PLA (контроль 1). В качестве контроля 2 использовали мембрану «Биопласт Дент» производства ЗАО «ОЭЗ «ВладМиВа», г. Белгород, как широко используемую для замещения костных дефектов после травматичного удаления зубов.

Образцы мембран 1×1 см в виде пленок толщиной 0,2–0,23 мм изготавливались на прессе Gotech GT-7014-H10C в соответствии с ГОСТ 12019-66. Перед биологическими испытаниями была проведена стерилизация исследуемых образцов под УФ излучением в течение 1 ч.

Далее на образцы была высажена культура клеток ФЭЧ, которые затем инкубировались на среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки в культуральных планшетах в течение 24 и 72 ч при 37 °С в условиях насыщающей влажности в атмосфере с 5 % CO₂.

После определенного периода инкубации (24 ч и 72 ч) был проведен анализ роста ФЭЧ с помощью флуоресцентной микроскопии окрашенных клеток. Бромистый этидий (EtBr) – это интеркалирующий агент, который благодаря своей способности образовывать прочные нековалентные комплексы с нуклеиновыми кислотами широко применяется в молекулярной биологии. При освещении ультрафиолетовым светом EtBr флюоресцирует оранжевым цветом.

К клеткам, инкубированным «на образцах остеопластических мембран, в культуральную среду добавляли флуоресцеиндиацетат (FDA) до конечной концентрации 25 мкг/мл и бромистый этидий до конечной концентрации 1 мкг/мл, и инкубировали 5 мин при 37⁰ С. Затем клетки три раза промывали средой без сыворотки и просматривали при помощи флуоресцентного микроскопа Olympus BX43 при длине волны возбуждения 280 нм с использованием красно-оранжевого фильтра TRITC (CY3)» [70].

Изображения ядер клеток на поверхности образцов были получены с помощью комплекса CytoLabView (Applied Spectral Imaging, Израиль), включающего в себя фотокамеру и программу обработки изображений FISHView System. «Неоднородная структура исследуемых образцов делает невозможным фокусировку объектива микроскопа на всей плоскости объекта, поэтому проводилось послойное изучение структуры образца с помощью инструментов программы FISHView System. На полученных изображениях наблюдались окрашенные ядра клеток ФЭЧ на поверхности образца мембраны с наночастицами серебра (Рисунок 4.2).

На микрографиях не видно тело клетки, в связи с тем, что бромистый этидий имеет свойство накапливаться в ядрах клетки, окрашивая цитоплазму крайне незначительно» [81]. На полученных изображениях заметно, что клетки имеют тенденцию к прикреплению между волокнами образца мембраны, прорастая

внутри структуры имплантата. Распределение клеток на всех образцах крайне неоднородно, что может быть следствием избирательной способности клеток к прикреплению к поверхности остеопластического материала. В ходе проведения эксперимента часть клеток осела и прикрепилась к поверхности лунок культурального планшета, в которых они находились.

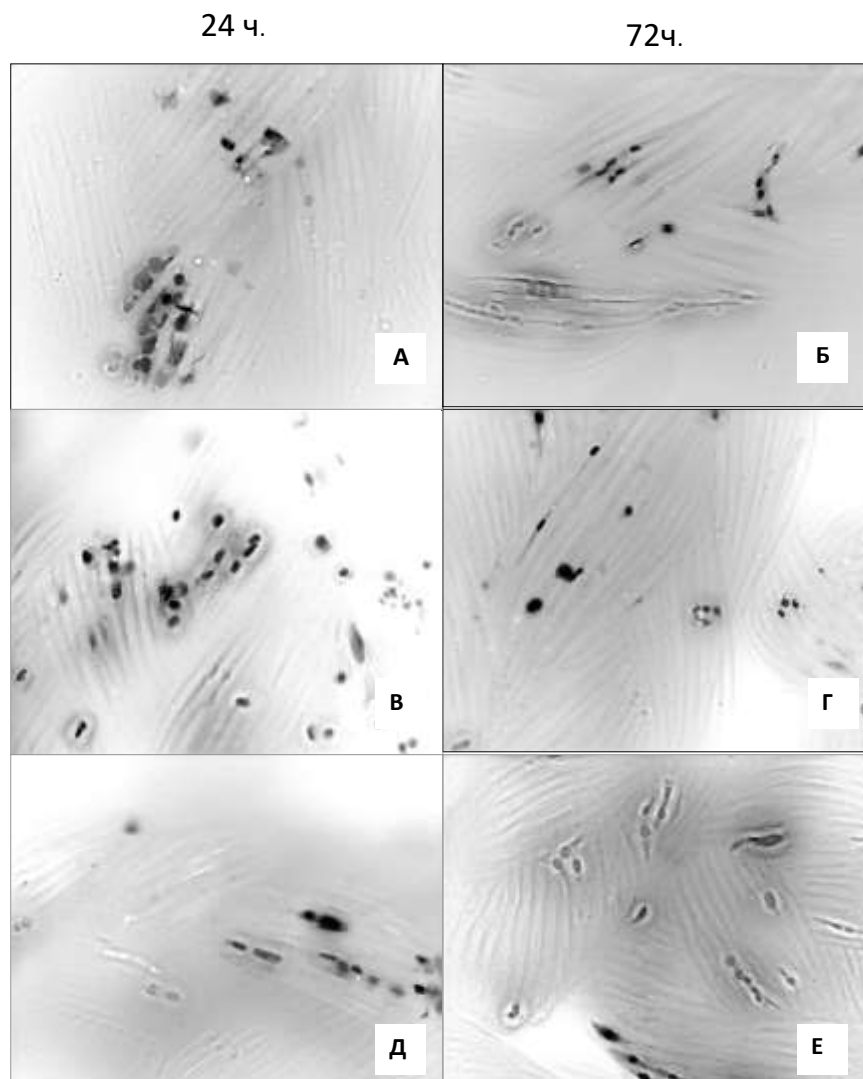


Рисунок 4.2 – Микроскопия. ФЭЧ на поверхности мембран: А,Б – PLA (контроль 1); В, Г – PLA-Ag; Д,Е – «Биопласт Дент» (контроль 2) после 24 ч и 72 ч инкубирования

Изображения, представленные на Рисунке 4.3, получены при совмещении двух фильтров микроскопа: Aqua (голубой) и CY3 (красный), т. к. в ходе экспериментов было обнаружено, что заготовка наноимплантатов флуоресцирует в голубой области спектра.

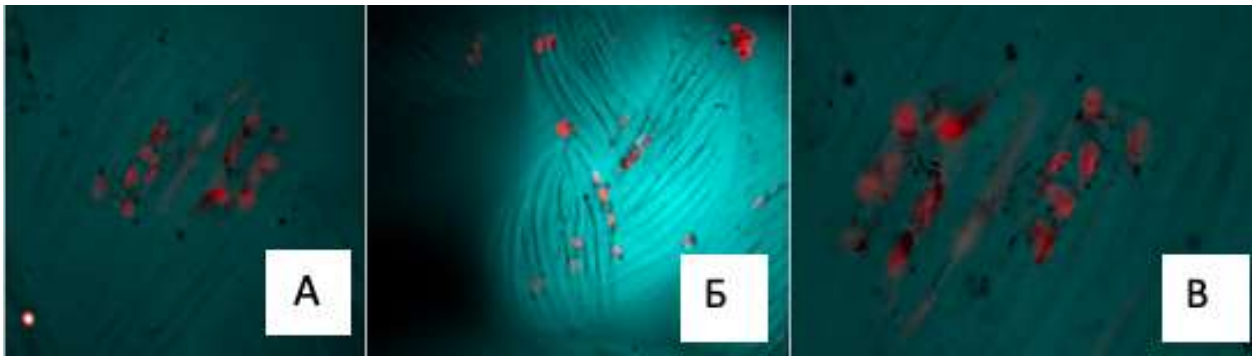


Рисунок 4.3 – Микрофотография. Микроизображения образцов мембран: А – PLA (контроль 1); Б – PLA-Ag; В – «Биопласт Дент» (контроль 2) с клетками ФЭЧ на их поверхности. Наночастицы Ag флуоресцируют в голубой области спектра, ядра ФЭЧ – в красной

В результате анализа микроизображений, полученных с помощью оптического микроскопа, было рассчитано среднее количество клеток на каждом образце для двух периодов времени инкубации. Сравнительная диаграмма представлена на Рисунке 4.4.

После проведения последовательного анализа всей поверхности образцов можно сделать вывод об цитокондуктивности мембран. Наибольшая активность клеток наблюдалась спустя 24 ч после инкубирования. Максимальное количество клеток отмечено на образцах мембраны PLA (50%) и PLA-Ag (55,0%).

Через 72 ч инкубирования ФЭЧ на поверхности исследуемых мембран наблюдалось увеличение пролиферативной активности ФЭЧ до уровня 55-70%. Среднее количество клеток на поверхности и внутри мембран через 72 ч инкубации увеличилось на 15–20 % ($p < 0,05$).

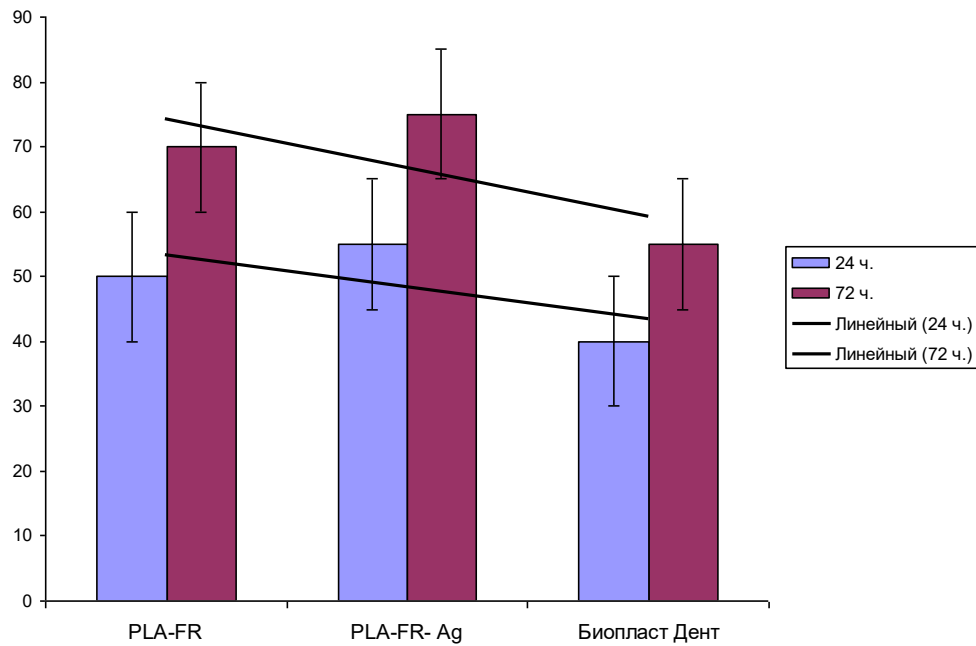


Рисунок 4.4 – Среднее количество клеток ФЭЧ, видимых на поверхности мембран PLA (контроль 1); PLA-Ag; «Биопласт Дент» (контроль 2) после 24 ч и 72 ч. инкубации. Различия между группами сравнения недостоверны

По уровню пролиферативной активности ФЭЧ в период от 24 ч. до 72 ч. мембраны PLA; PLA-Ag; «Биопласт Дент» между собой достоверно не отличались ($p=0.05$).

Таким образом, наилучшая пролиферативная активность ФЭЧ наблюдалась на начальном этапе пролиферации (24 ч.) мембраны PLA-Ag, модифицированной наночастицами серебра (55% и 75% соответственно). При этом показано положительное влияние наночастиц Ag на рост и пролиферацию клеток соединительной ткани – фибробластов эмбриона человека.

Далее образцы с зафиксированными клетками ФЭЧ исследовали на микроскопе JSM – 50a для анализа структуры клеток на поверхности мембран. Исследования проводили в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении электронной колонны 5 кВ и токе электронного зонда 50 пА. Изображения, полученные с помощью микроскопа, демонстрировали рост, вытягивание и распластывание клеток на поверхности мембран с течением времени (Рисунок 4.5).

Через 3 ч после инкубации клетки ФЭЧ частично сохраняли округлую форму, что указывает на незавершенность процесса прикрепления клеток к поверхности образцов. Через 48 ч наблюдалось вытягивание клеток, они приобретали продолговатую форму, их количество значительно увеличивалось. На изображениях заметны ядра клеток и многочисленные псевдоподии, при помощи которых клетки крепятся к поверхности исследуемых мембран.

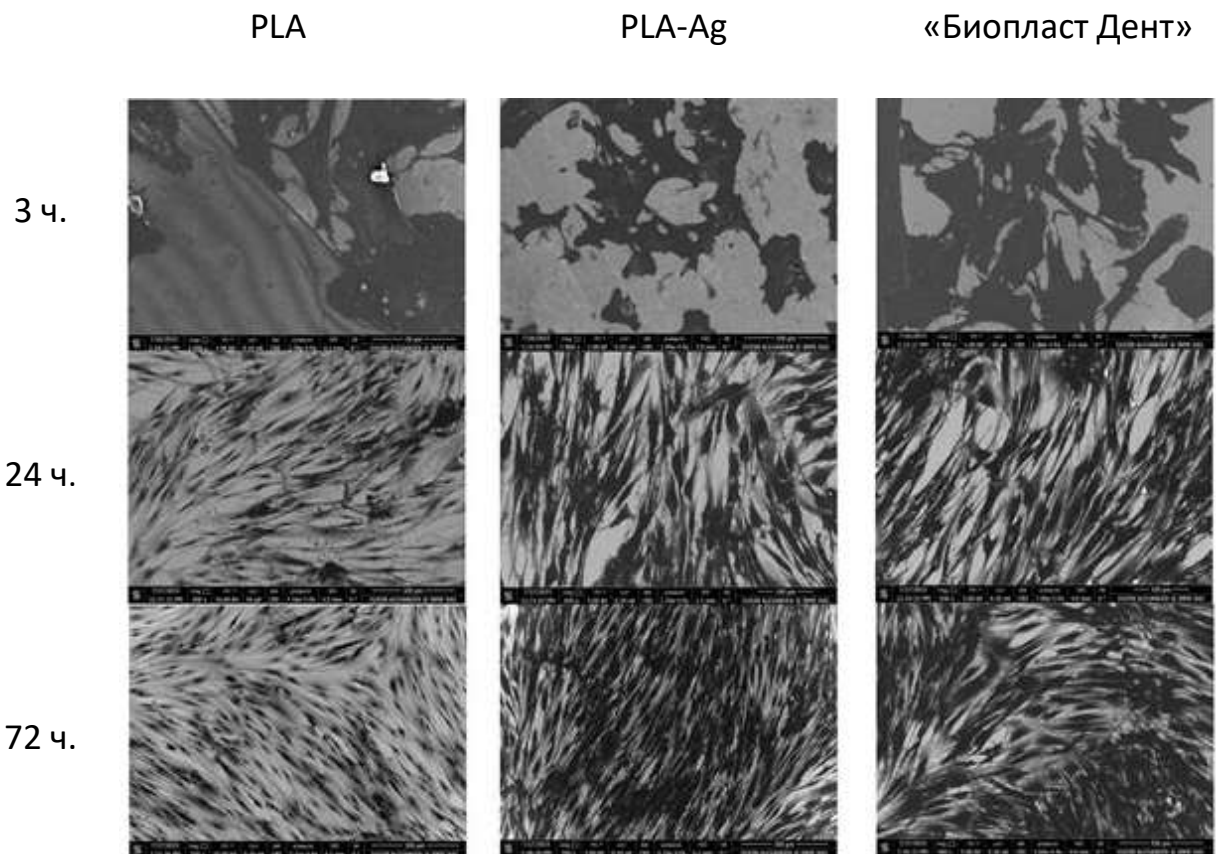


Рисунок 4.5 – Изображения клеток ФЭЧ на поверхности образцов мембран с разными периодами инкубации. Изображения получены при помощи растрового электронного микроскопа JSM – 50a

Через 72 ч инкубации клетки полностью заполняли поверхность образцов мембран. На изображениях видны ядра клеток (темные области). Наблюдался рост клеток в несколько слоев. В результате исследования биосовместимости и цитокондуктивности полилактидной мембраны, модифицированной наночастицами серебра PLA-Ag установлено, что клетки соединительной ткани

ФЭЧ (фибробласты эмбриона человека) колонизировались на поверхности и внутри мембраны.

Отмечено положительное влияние наночастиц серебра на рост клеток соединительной ткани и в целом могут способствовать их росту. Исследование структуры клеток на поверхности мембраны методом атомно-силовой микроскопии показало, что в процессе роста клетки ФЭЧ уплотнились, одновременно занимая большую площадь поверхности. С увеличением времени инкубации наблюдалось большее количество клеток в сравнении с предыдущими периодами.

Таким образом, экспериментально доказана возможность роста и развития клеток соединительной ткани на поверхности и остеопластической мембраны, модифицированной наночастицами серебра PLA-Ag.

4.1.5. Исследование токсичности и биосовместимости на самках белых крыс

Целью испытаний токсикологических исследований остеопластических материалов *in vivo* является оценка безопасности их применения в клинической практике. Эксперимент проводили на 10 самках белых крыс, массой 300–350 г., которым под кожу в область межлопаточного пространства имплантировали образцы мембран PLA-Ag и PLA (контроль 1). Контрольным животным имплантировали стерильные диски из биологически инертного стекла (контроль 2).

Операцию проводили в стерильных условиях, под наркозом. Кожу в месте имплантации обрабатывали антисептическим раствором и делали разрез с помощью микрохирургических ножниц. Подкожные карманы для контрольных стеклянных дисков и образцов мембран формировали с помощью стерильного пинцета. После имплантации разрезы закрывали стерильным рассасывавшимся хирургическим шовным материалом и обрабатывали антисептиком (Рисунок 4.6).



Рисунок 4.6 – Имплантация остеопластической мембраны в подкожный карман белым крысам: А – введение мембраны в сформированный подкожный карман; Б – место имплантации остеопластической мембраны; С – место имплантации стеклянного диска (контроль)

После проведения имплантации прооперированные подопытные животные были помещены в индивидуальные клетки, где и содержались в течение последующих 21 суток с соблюдением надлежащих условий содержания и кормления. По окончании эксперимента животных умертвляли, изучали гематологические и биохимические показатели крови, определяли весовые коэффициенты внутренних органов.

«На вскрытии животных макроскопически не выявлено патологических изменений внутренних органов и тканей. Коэффициенты масс внутренних органов опытных животных и соотношение массы иммунокомпетентных органов (тимус, селезёнка) не имели статистически достоверных отличий от аналогичных показателей» [48] у животных в контроле.

В Таблице 4.3 представлены показатели сыворотки крови крыс при подкожной имплантации экспериментальных образцов. В Таблице 4.4 указаны гематологические показатели крови крыс при подкожной имплантации экспериментальных образцов.

Таблица 4.3 – Биохимические показатели сыворотки крови крыс при подкожной имплантации образцов мембран. Различия между группами сравнения недостоверны

| Показатель | АЛТ, Ед/л | АСТ, Ед/л | Общ. белок., моль/л | Альб., моль/л | Мочевина, моль/л | ШФ., Ед/л | Билирубин, моль/л | Кальций, моль/л |
|--|--------------|--------------|---------------------------|------------------|---------------------|--------------|----------------------|--------------------|
| Мембрана PLA-FR-Ag | | | | | | | | |
| М | 32,64 | 108,01 | 81,12 | 33,45 | 4,92 | 182,11 | 2,48 | 2,29 |
| m | 1,52 | 9,1 | 4,86 | 1,09 | 0,47 | 12,17 | 0,49 | 0,24 |
| Мембрана PLA-FR (контроль 1) | | | | | | | | |
| М | 32,26 | 107,08 | 80,02 | 33,35 | 4,52 | 181,13 | 2,59 | 2,21 |
| m | 1,58 | 9,05 | 4,96 | 1,16 | 0,50 | 12,14 | 0,40 | 0,28 |
| Стерильные диски из биологически инертного стекла (контроль 2) | | | | | | | | |
| М | 32,48 | 106,34 | 79,72 | 33,10 | 4,69 | 180,35 | 2,68 | 2,19 |
| m | 1,61 | 8,97 | 4,92 | 1,01 | 0,54 | 12,09 | 0,44 | 0,23 |

Результаты исследований с помощью лабораторных методов оценки состояния систем и органов, ответственных за метаболизм и элиминацию чужеродных химических агентов, не выявило отличий в излучавшихся показателях у испытуемых животных в сравнении с контролем.

Таблица 4.4 – Гематологические показатели периферической крови крыс при подкожной имплантации образцов мембран. Различия между группами сравнения недостоверны

| Показатель | L, тыс/мкл | Er, млн/мкл | Hb, г/л | Цвет. показатель |
|--|------------|-------------|-------------|------------------|
| Мембрана PLA-Ag | | | | |
| M±m | 11,11±0,31 | 5,92±0,17 | 182,98±5,60 | 0,93±0,07 |
| Мембрана PLA (контроль 1) | | | | |
| M±m | 10,01±0,28 | 5,89±0,13 | 179,98±5,13 | 0,91±0,11 |
| Стерильные диски из биологически инертного стекла (контроль 2) | | | | |
| M±m | 8,89±0,32 | 6,01±0,11 | 181,21±4,68 | 0,94±0,03 |

Таблица 4.5 – Масса тела и весовые коэффициенты внутренних органов крыс при подкожной имплантации образцов мембран. Различия между группами сравнения недостоверны

| Показатели | Мембрана PLA-Ag | Мембрана PLA (контроль 1) | Стерильные диски из биологически инертного стекла (контроль 2) | p |
|-----------------|-----------------|---------------------------|--|--------|
| Масса тела 1 | 315,62±7,59 | 313,40±8,64 | 308,12±5,65 | p>0,05 |
| Тимус | 0,66±0,017 | 0,64±0,02 | 0,63±0,04 | |
| Печень | 27,22±1,48 | 27,06±1,52 | 26,95±1,20 | |
| Селезенка | 2,92±1,09 | 2,91±0,11 | 2,92±0,19 | |
| Тимус/селезенка | 0,22±0,03 | 0,22±0,01 | 0,23±0,02 | |
| Почки | 6,44±0,42 | 6,10±0,54 | 6,52±0,35 | |
| Масса тела 2 | 346,12±4,59 | 342,00±4,27 | 337,69±6,17 | |

Достоверных отклонений в коэффициентах массы внутренних органов в опытных группах по сравнению с контрольными так же не обнаружено (Таблица 4.5).

Таким образом, результаты токсикологических исследований *in vivo* не выявили достоверных изменений биохимических и гематологических показателей периферической крови сыворотки крови крыс при подкожной имплантации мембраны на основе «полилактид-фиброина», модифицированной наночастицами серебра PLA-Ag. «Коэффициенты масс внутренних органов животных и соотношение массы иммунокомпетентных органов (тимус, селезёнка) не имели статистически достоверных отличий от аналогичных показателей» [48] у животных в контроле, что позволяет сделать вывод об отсутствии токсичности исследуемой мембраны, что свидетельствует о безопасности ее применения в клинической практике.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОРЕЗОРБИРУЕМОЙ МЕМБРАНЫ НА ПОЛИМЕРНОЙ ОСНОВЕ С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОСТНОЙ ТКАНИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

5.1. Исследование регенерации костной ткани на критическом дефекте свода черепа кролика породы Шиншилла

Оптимальным методом для изучения восстановления тканей кости является изучение регенерации критического дефекта теменной кости у лабораторных животных. Результат эксперимента позволяет получить воспроизводимые данные и дает возможность сравнить их с другими исследованиями. Подобная модель часто используется для изучения эффекта исследуемых остеозамещающих материалов и барьерных биорезорбируемых мембран в эксперименте на лабораторных животных, к примеру, на критическом дефекте теменной кости свода черепа.

Данное исследование было проведено на 24 особях самцов кроликов породы Шиншилла.

Основными критериями для включения в эксперимент явились: здоровые животные, подтвержденные клинико-лабораторными методами исследования, массой – 3,8–3,9 кг; возрастом – 3–5 лет, отсутствие каких-либо клинически значимых постоперационных осложнений, заболеваний нервной и опорно-двигательной систем, без противопоказаний к проводимой фармакотерапии. Показатели, размеры, видимые повреждения, состояние костных и мышечных структур в пределах нормы.

Показателями исключения служили: диагностированные ранее заболевания злокачественных опухолей, признаки заболевания нервной и опорно-двигательной систем, а также выявление патологии воспалительного характера, на начальном этапе и наличие противопоказаний к использованию наночастиц серебра, антибактериальных средств.

Всех экспериментальных особей разделили на 2 группы по 12 животных: PLA – контрольная группа (n=12) и PLA-Ag – экспериментальная группа (биорезорбируемая мембрана на основе полилактида с нанесенными наночастицами коллоидного серебра) (n=12). Контрольной группе испытуемых внутримышечно вводили пенициллин (2,5 мл; 7 дней).

В процессе имплантации мембраны PLA и PLA-Ag помещали в область костного дефекта (Рисунок 5.1). Срок наблюдения составлял соответственно протоколу 14, 28, 42 дня. В указанные сроки проведена биопсия.

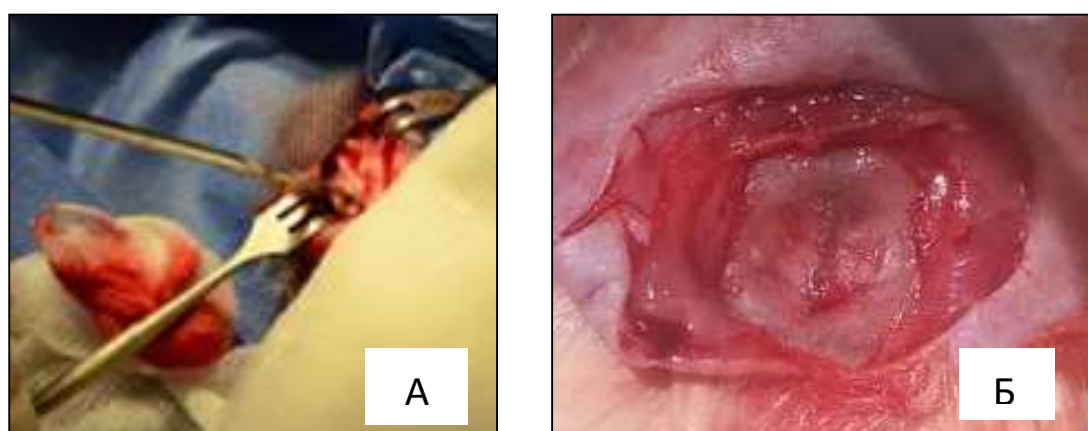


Рисунок 5.1 – Проведение операции на черепе кролика породы Шиншилла: А – формирование критического костного дефекта для имплантации мембраны; Б – сформированный критический костный дефект для установки мембраны

На 14-е сутки после операции по 4 животных из каждой группы выводились из эксперимента. После трепанации черепа послеоперационный участок (мягкие ткани и затылочная кость черепа 4×3 см) отправлены на гистологическое и иммуногистохимическое исследование.

Микроскопическое описание регенерата в области дефекта.

В контрольной группе PLA (n=6) отмечали следующую картину: между структурами сохранившейся мембраны (20–40%) выраженное хроническое воспаление с преобладанием эозинофилов, лимфоцитов и макрофагов ($38,1 \pm 5,3\%$; $18,2 \pm 4,8\%$ и $27,3 \pm 4,5\%$, соответственно), единичные полиморфноядерные лейкоциты, по периферии импланта формирующаяся соединительнотканная капсула, представленная коллагеновыми волокнами и фибробластами. Один

образец с полями клеточного детрита. В образцах экспериментальной группы PLA-Ag (n=6) наблюдали различную степень сохранности мембран (5–48%), незначительную воспалительную реакцию с единичными лимфоцитами и макрофагами и замещение мембран сетью тонких коллагеновых волокон и фибробластами без признаков оформленной капсулы (Рисунок 5.2 А).

По линии дефекта наблюдались допустимые признаки дистрофии тканей кости и слабая лимфогистиоцитарная инфильтрация. На глубине данного дефекта визуализировалось образование волокнистой соединительной ткани, а также наблюдалось образование костной ткани, зрелость которой увеличивалась по мере удаления от дефекта (Рисунок 5.2 Б).

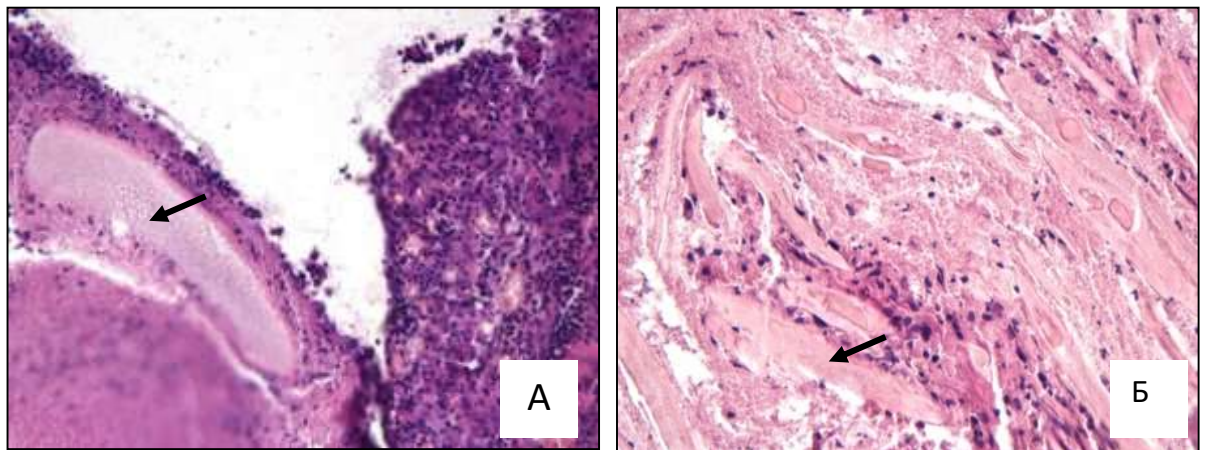


Рисунок 5.2 – Результаты гистологического исследования в контрольной PLA (А) и экспериментальной PLA-Ag (Б) группах (14 сутки). Окраска гематоксилином и эозином (H&E), увелич. $\times 400$; мембрана указана стрелкой

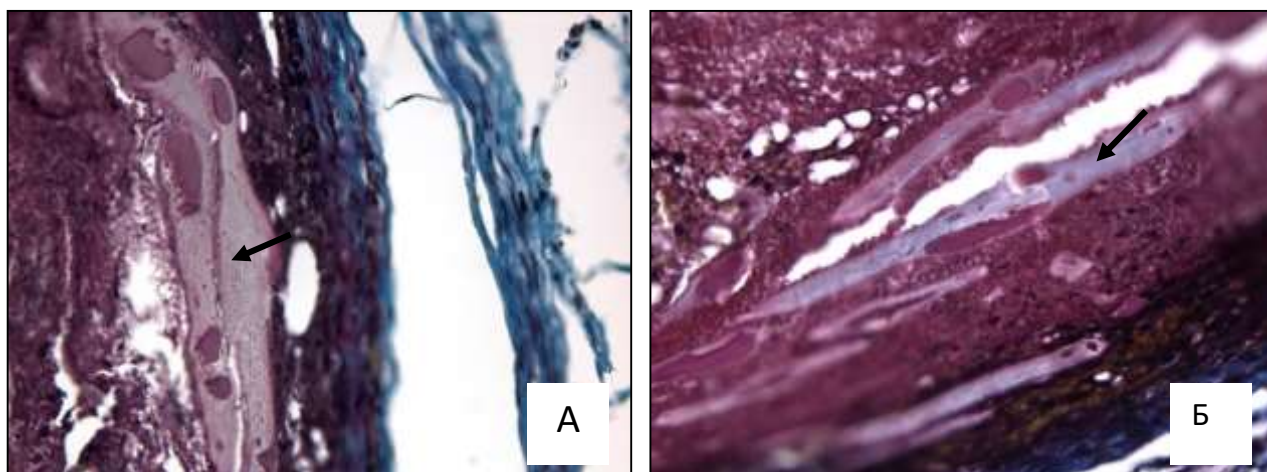


Рисунок 5.3 – Результаты гистохимического исследования в контрольной PLA (А) и экспериментальной PLA-Ag (Б) группах (14 сутки). Окраска гематоксилином и эозином (H&E), увелич. $\times 400$; мембрана указана стрелкой

При окраске по Массону в экспериментальной группе PLA-Ag выявили снижение доли толстых коллагеновых волокон (синее окрашивание) и наличие эластических волокон (красно-желтое окрашивание) в сравнении с контрольной группой PLA (Рисунок 5.3).

Данные иммуногистохимического исследования костно-мышечного лоскута. В контрольной группе PLA ($n=6$) обнаружена умеренная положительная реакция с антителами к CD3 ($17,3\pm 5,2\%$) и CD30 ($14,1\pm 3,6\%$), в том числе в межклеточном матриксе. Маркирование на CD15 показало слабую иммунопозитивную реакцию ($3,4\pm 1,2\%$). В экспериментальной группе PLA-Ag ($n=6$) все иммуномаркеры продемонстрировали слабую положительную реакцию: CD3 ($6,5\pm 3,1\%$), CD30 ($3,1\pm 1,4\%$), CD15 ($1,2\pm 0,5\%$), со статистически достоверным уменьшением числа клеток, иммунопозитивных в отношении CD3 ($p=0,03$) и CD30 ($p=0,01$) (Рисунок 5.4).

Умеренную положительную реакцию на Т-лимфоциты (с антителами к CD3) отмечали в образцах мембран из PLA-Ag и PLA (Таблица 5.1), с тенденцией к ее снижению в последних. Маркирование на активированные Т-лимфоциты (CD30) и нейтрофилы (CD15) показало слабую иммунопозитивную реакцию во всех случаях. Однако в препаратах с мембраной PLA-Ag доля иммунопозитивных

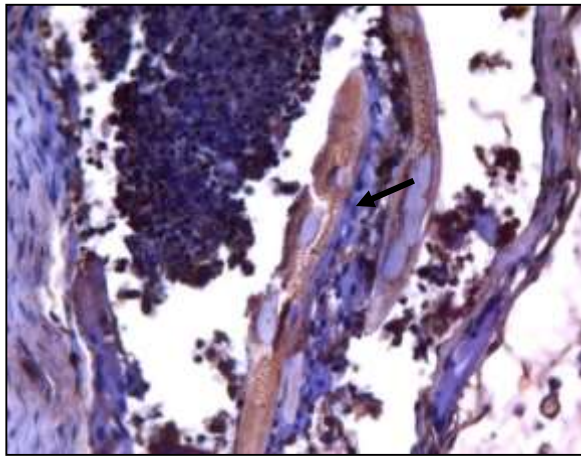
клеток была достоверно ниже, чем в препаратах с мембраной PLA без наночастиц серебра ($p > 0,05$).

Таблица 5.1 – Результаты иммуногистохимического исследования парафиновых срезов препаратов с мембранами PLA и PLA-Ag. Различия между группами сравнения недостоверны

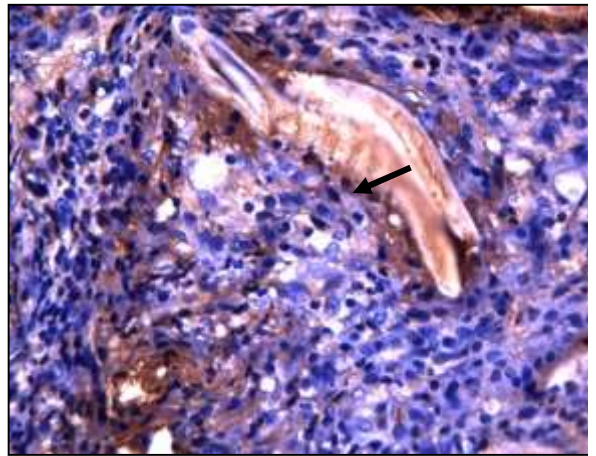
| Маркеры | PLA-Ag | PLA (контроль) | P |
|---------|---------|----------------|------------|
| CD3 | 8,1±2,5 | 27,3±5,7 | $p > 0,05$ |
| CD30 | 2,1±0,9 | 7,2±2,5 | $p > 0,05$ |
| CD15 | 1,3±0,6 | 4,3±1,6 | $p > 0,05$ |

Полученные результаты свидетельствуют о достаточной противомикробной активности покрытия остеопластической мембраны с наночастицами серебра PLA-Ag при использовании в качестве их источника коллоидного раствора.

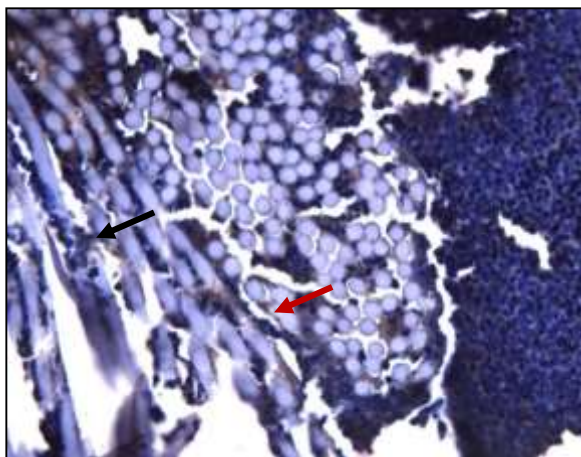
Уменьшение доли CD3+ и CD30+ клеток демонстрирует снижение активности воспалительного ответа на инородное тело, в особенности со стороны активированных лимфоцитов. Миграция макрофагов и нейтрофилов также происходила менее активно в экспериментальной группе PLA-Ag, хотя снижение уровня CD15-иммунопозитивности не достигло статистической значимости. Данная картина наряду с уменьшением выраженности фиброобразования в виде формирования организованной капсулы свидетельствует о подавлении воспалительной реакции на всех этапах ее развития.



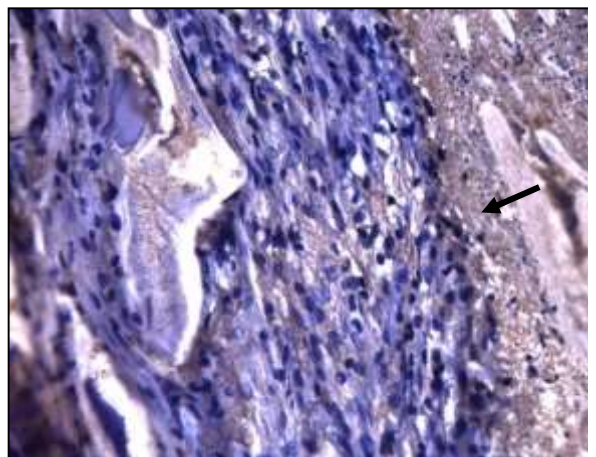
CD3



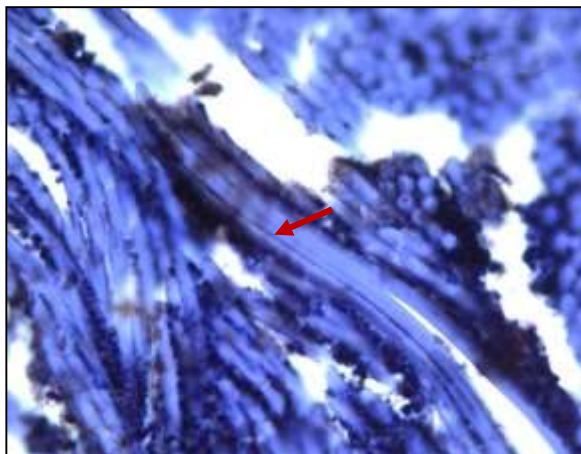
CD3



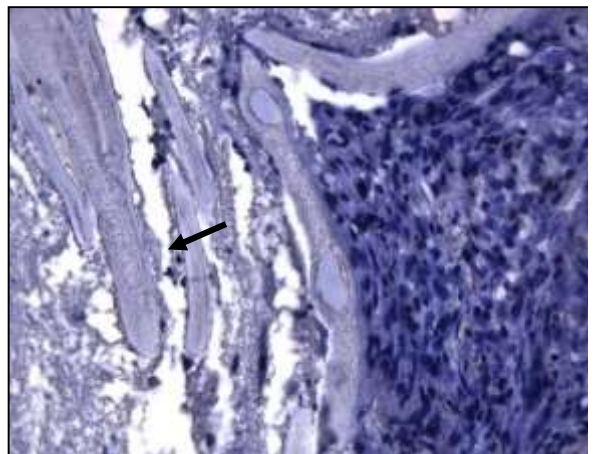
CD30



CD30



CD15



CD15

Рисунок 5.4 – Результаты иммуногистохимического исследования в контрольной PLA (слева) и экспериментальной PLA-Ag (справа) группах. Антитела к: CD3 (лимфоциты), CD30 (активированные лимфоциты), CD15 (нейтрофилы) (14 сутки). Докрашивание гематоксилином, увелич. $\times 400$; мембрана указана стрелкой

Таким образом, использование раствора коллоидного серебра для покрытия наночастицами остеопластических мембран имеет потенциал в качестве противомикробного и противовоспалительного агента. При этом картина морфологии у микропрепаратов, полученных на четырнадцатые сутки после оперативного вмешательства, показывает, что процесс возникновения аутолиза костных тканей является более ранним, а воспаление в области повреждения быстрее снижается в экспериментальной группе PLA-Ag. В то время, как в контрольной группе PLA к данным срокам все еще наблюдалась дистрофия измененных тканей, визуализировались участки с отдельной лимфогистиоцитарной инфильтрацией, а также небольшие очаги некроза тканей кости.

В ходе последующего мониторинга гистоморфологической картины отмечен процесс выраженной репаративной регенерации у особей экспериментальной группы PLA-Ag.

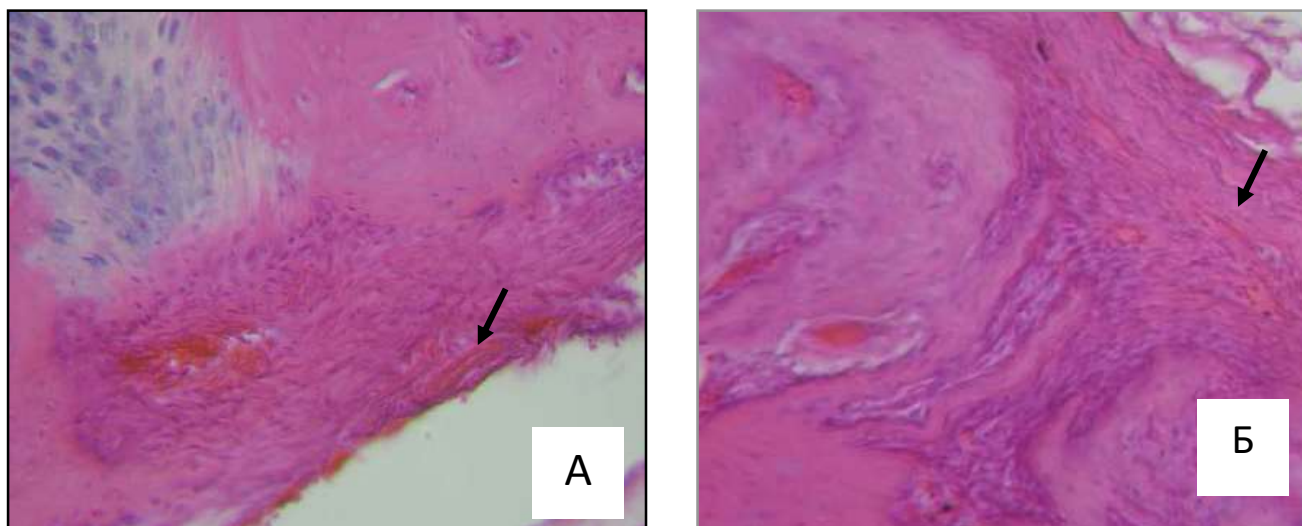


Рисунок 5.5 – Результаты гистологического исследования экспериментальной мембраны PLA-Ag на 28 сутки (А) и 42 сутки (Б). Окраска гематоксилином и эозином (H&E), увелич. $\times 200$; мембрана указана стрелкой

Через четырнадцать дней (28-е сутки после проведенного оперативного вмешательства) в экспериментальной группе PLA-Ag на уровне дефекта костная мозоль преобразовывалась и была выражена грубоволокнистой соединительной

тканью (Рисунок 5.5 А). Отмечено формирование незрелой костной пластинки с большим скоплением фибробластов на ее поверхности. Численность остеоцитов была значительно меньше, чем количество остеобластов в слое костных трабекул, сформированные ячейки заселялись гемопоэтическими элементами.

На 42-е сутки от начала проведения эксперимента созревающая костная мозоль продолжала формироваться. Участки соединительной ткани визуализировались в незначительных количествах, в основном наблюдались костно-хрящевые компоненты, находящиеся в процессе ремоделирования. Однако, в отдельных участках мозоли встречались единичные хондроциты. В просвете молодых костных балок находилось значимое количество остеобластов и остеокластов, что говорит о активных процессах формирования костной ткани. На верхних уровнях линии дефекта все еще продолжала наблюдаться грубоволокнистая соединительная ткань, с большим количеством фибробластов (Рисунок 5.5 Б).

По итогу, за прошедшие 42 дня после проведенного закрытия костной раны биорезорбируемой барьерной мембраной с наночастицами серебра (PLA-Ag), ранее сформированный дефект был полностью выполнен незрелой костной тканью, входящие в ее состав балки расположены и ориентированы правильно. В полученных результатах гистологического и иммуногистохимического исследований нашлось подтверждение целесообразности использования мембраны с входящими в ее состав наночастицами серебра. И дает нам сделать вывод, что использование таких материалов в реконструктивных операциях, в связи с выраженным антибактериальным и противомикробным эффектом, способствует быстрому снижению воспалительного процесса в поврежденной ткани и как следствие, ускорению последующей активации процессов регенерации костной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно источникам, данным Министерства Здравоохранения Российской Федерации к 2021 году количество пациентов, требующимся стоматологическая помощь по поводу восстановления зубочелюстного аппарата 16 млн человек. На 1000 больных в лечении у стоматолога-ортопеда нуждаются 400-600 человек.

На данный момент медицинской практике наработан значимый клинический опыт по устранению дефектов альвеолярных отростков челюстей и восстановлению зубных рядов с помощью дентальных имплантатов, при помощи таких хирургических методов как направленная костная регенерация, аутотрансплантация костной ткани, межкортикальная и ротационная остеотомия. В случае проведения такого рода оперативных вмешательств за частую приходится использовать синтетические аллогенные и искусственные костнозамещающие материалы, а также барьерные биорезорбируемые мембраны. Для этого необходима высокая биосовместимость и подходящая срокам формирования новой костной ткани способность резорбирования.

В то же время современным и важным вопросом является изобретение принципиально новых медицинских изделий и материалов с высокими антисептическими свойствами, которые могли бы значительно снизить надобность в назначении антибиотикотерапии, тем самым уменьшив количество осложнений со стороны желудочно-кишечного тракта на фоне приема антибактериальной терапии и распространение антибиотикорезистентности.

Данное исследование наглядно показывает, что использование коллоидных растворов наночастиц серебра в качестве антисептического компонента барьерной биорезорбируемой мембраны для изолирования объекта костной аугментации является перспективным. В наше время абсолютно точно известно и доказано, что частицы Ag обладают выраженным противомикробным, антибактериальным действием и является очень эффективным средством в борьбе с вирулентными микроорганизмами. Такое возможно благодаря очень маленьким размерам

наночастицы серебра. Они способны проходить через клеточные мембраны и разрушать патогенные клетки изнутри.

Наночастицы Ag показали более высокую противовоспалительную активность при использовании в медицинской практике, чем такие антисептики как хлоргексидин, мирамистин и нитрат серебра. Доказано, что они вызывают разрушение биопленок, созданных различными резистентными штаммами микробов. Вместе с этим серебро также является хорошим иммуностимулятором и по своим возможностям сравним со стероидами. Отталкиваясь от дозировки его наночастицы могут способствовать улучшению или подавлению процесса фагоцитоза. При воздействии на организм производится умножение количества иммуноглобулинов классов А, М, G и Т-лимфоцитов, что может помочь в лечении различной патологии полости рта, вызванной микроорганизмами.

Создание остеопластических мембран в комбинации с наночастицами Ag с целью увеличения их антимикробного и противовоспалительного действия стало возможным благодаря развитию регенеративной медицины.

В данной работе описаны результаты исследований разработанной нами барьерной биорезорбируемой мембраны на полимерной основе с нанесенными на нее наночастицами Ag, используемых при оперативных вмешательствах, направленных на костную аугментацию для повышения приживаемости имплантатов, устанавливаемых на места костных дефектов альвеолярной кости. В ходе исследований была разработана методика нанесения наночастиц Ag на остеопластическую мембрану для придания ей бактерицидных и бактериостатических свойств.

В исследовании были использованы следующие материалы: остеопластическая мембрана на основе полилактида и фиброина шелка (PLA-FR) производства ООО «Фибрасофт» следующего состава: раствор полилактида (100 мг/мл) «Sigma-Aldrich Co. LLC» (США) и раствор фиброина шелка (100 мг/мл) «Xi'an Lyphar Biotech Co., LTD» (Китай) в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол-2 «Sigma-Aldrich Co. LLC» (США); смешивались в пропорциях: полилактид – 50% + шелк – 50%. Образцы мембраны PLA-FR изготавливались методом

электроспиннинга и представляли собой равномерно распределенные волокна, уложенные в несколько слоев размером 1×1 см в виде пленок толщиной 0,2-0,23 мм.

Гидрозоля наночастиц серебра «НанАргол» производства ООО НПК «Наномет» (г. Москва; Свидетельство №: RU.77.99.11.003. E.001609.03.13 от 01.03.2013) составом: коллоидное наносеребро – 0,2 мг/мл, измеренного при температуре $23 \pm 2^{\circ}$ С, вода, натрий лимоннокислый.

«В качестве сравнения использовалась остеопластическая мембрана «Биопласт-дент», производства ЗАО «ОЭЗ «ВладМиВа» (г. Белгород, Россия) на основе ксеноколлагена и костного гидроксиапатита, содержащая сульфатированные гликозаминогликаны в пределах биологической нормы (не менее 800 мкг/см³)» [115].

Экспериментальные исследования согласно цели и задачам выполняемой работы проводились в четыре этапа:

I этап – разработка методики нанесения гидрозоля наночастиц серебра Ag на мембрану;

II этап – исследование мембраны, с нанесёнными на неё наночастицами Ag, на культуре клеток *in vitro*;

III этап – изучение биосовместимости разработанной мембраны *in vivo* на живой животной модели;

IV этап – исследование влияния разработанной мембраны на регенерацию костной ткани в эксперименте на животных.

На первом этапе исследования была разработана методика нанесения гидрозоля наночастиц Ag на остеопластическую мембрану. В соответствии с паспортом качества гидрозоля «НанАргол» концентрация наночастиц Ag – 0,2 мг/мл; «наночастицы имели сферическую форму и размеры от 0,5 до 3 нм. Разброс по размерам составлял $\pm 0,2$ нм. Срок годности – от 6 мес. до 2-х лет с даты изготовления. Размеры наночастиц Ag определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) на приборах Coulter N4 MD (Coulter Electronics, США) и Horiba LB 550 (Horiba, Япония). Микрофотографии наночастиц

получали методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) с использованием электронного микроскопа LEO912 AB OMEGA с ускоряющим напряжением 120 кВ (Carl Zeiss, Германия)» [11].

Методика основана на погружении мембраны PLA в раствор гидрозоля наночастиц Ag «НанАргол» до состояния полного впитывания, непосредственно перед практическим использованием. Адсорбция наночастиц Ag на поверхности волокон мембраны была подтверждена с помощью растрового электронного микроскопа «Tescan» «Vega 3SB» с энергодисперсионным анализатором «10mm2 SDD Detector - X-Act». Агрегаты наночастиц Ag были равномерно распределены по всему объему мембраны PLA-Ag (Рисунок 3.11). Благодаря капиллярному впитыванию раствора в пористую структуру и адсорбции высокоэнергетических наночастиц Ag на поверхности полимерных волокон, в дальнейшем в местах контакта мембраны с поврежденными мягкими и костными тканями формируется антимикробная зона, препятствующая появлению и развитию нежелательной микрофлоры.

С помощью разработанной методики были получены образцы мембраны из полилактида с нанесенными на нее наночастицами Ag (PLA-Ag). Исследование скорости деградации образцов разработанной мембраны показало сохранность ее свойств разработанной мембраны в физиологическом водном 0,9 мас. % растворе NaCl, имитирующем свойства сыворотки крови. Отсутствие токсичности гидрозоля наночастиц Ag (0,2 мг/мл) подтверждено в тесте на выживаемость рачков *Daphnia magna* Straus [118] на серии растворов наночастиц Ag в концентрациях: 0,001; 0,002; 0,02; 0,2; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 мг/мл. Контролем служили растворы без наночастиц Ag.

На втором этапе исследования проведено изучение образцов остеопластической мембраны из полилактида и фиброина шелка с наночастицами Ag (PLA-Ag) на культурах клеток *in vitro*. Исследование цитотоксичности выполняли на культурах клеток нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов, способных интернализировать наноматериалы и принимать активное участие в реакциях приживления и (или) отторжения имплантатов [90; 146; 155].

Стандартным методом оценки жизнеспособности клеток являлась окраска остморральными красителями [77]. В качестве контроля использовалась исходная остеопластическая мембрана без наночастиц Ag (PLA) и клеточная взвесь без образцов мембран. Жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов для мембран PLA и PLA-Ag достигала 97–98% ($p < 0,05$) и статистически не отличалось от показателя в контрольных культурах клеток (98–99%), что подтвердило отсутствие цитотоксичности разработанной мембраны. Подсчет индекса выживаемости лейкоцитов после контакта с образцами исследуемых мембран, проведенный с помощью камеры Горяева, подтвердил отсутствие негативного влияния остеопластического материала мембраны и наночастиц Ag на лейкоциты крови.

Исследование цитокондуктивности и биосовместимости мембраны проводили на культуре клеток соединительной ткани – фибробластах эмбриона человека (ФЭЧ). На образцы мембран PLA-Ag и PLA размером 1×1 см была высажена культура клеток ФЭЧ, которые затем инкубировались на среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки в культуральных планшетах в течение 24 и 72 ч при 37 °С в условиях насыщающей влажности в атмосфере с 5% CO₂. После определенного периода инкубации (24 ч и 72 ч) был проведен анализ роста ФЭЧ с помощью флуоресцентной микроскопии окрашенных клеток бромистым этидием [59]. Изображения ядер клеток на поверхности образцов мембран получали с помощью комплекса CytoLabView (Applied Spectral Imaging, Израиль) и инструментов программы FISHView System. Рост клеток на поверхности мембраны оценивали методом растровой электронной микроскопии (РЭМ). Далее образцы с зафиксированными клетками ФЭЧ исследовали на микроскопе JSM – 50a для анализа структуры клеток на поверхности мембран.

В результате исследования было установлено, что клетки соединительной ткани ФЭЧ колонизировались на поверхности и внутри мембраны «полилактид-фиброин» с нанесенными наночастицами серебра (PLA-FR-Ag). Показано положительное влияние наночастиц Ag на рост клеток соединительной ткани. Исследование структуры клеток на поверхности мембраны методом атомно-

силовой микроскопии показало, что в процессе роста клетки ФЭЧ уплотнились, одновременно занимая большую площадь поверхности. С увеличением времени инкубации наблюдалось большее количество клеток. Таким образом, было доказана возможность роста и развития клеток соединительной ткани на поверхности и остеопластической мембраны, модифицированной наночастицами серебра PLA-Ag.

Исследование антимикробной активности разработанной мембраны проводили с использованием 18 клинических штаммов *Streptococcus pyogenes* (Ф0188; Ф0387; Ф0392; Ф0402; Ф0404; Ф0422), *Escherichia coli* (Ф0030; Ф0036; Ф0068; Ф0093; Ф00211; Ф00286), *Staphylococcus aureus* (Ф0005; Ф0223 Ф0248; Ф0322; Ф0396; Ф0412), выделенных от пациентов с инфекционными осложнениями после установки стоматологических имплантатов. В контроле использовалась мембрана без наночастиц Ag (PLA). Полученные результаты позволили судить о высокой антибактериальной активности наночастиц Ag, входящих в состав мембраны PLA-Ag в отношении клинических штаммов *S. aureus* (100%) и удовлетворительной в отношении *S. pyogene* (50%) и *E. coli* (33%). В контроле наблюдался сплошной рост микроорганизмов. Таким образом, придание бактерицидного эффекта материала изолирующих мембран, используемых для замещения дефектов костной ткани возможно за счет дополнительного введения в их состав наночастиц Ag, обладающих направленным антимикробным действием.

На третьем этапе исследования проведено изучение образцов мембраны PLA-Ag в экспериментах на животных. Экспериментальные исследования *in vivo* были выполнены на 9 самках белых крыс (массой 300–350 г.); 24 кроликах самцах породы Шиншилла (возраст 3–5 лет; масса 3,8–3,9 кг) в соответствии с нормативными документами, регулирующими работу с лабораторными животными. Животным выполняли хирургическое вмешательство по установке остеопластических мембран. Срок наблюдения по соответствующему протоколу составил 14, 28, 42 дней. После выведения животных из эксперимента, биопсийный материал направляли на гистологию.

Исследования токсичности in vivo проводили с целью оценки безопасности мембраны и возможности ее использования в клинической практике. Имплантация остеопластической мембраны в подкожный карман белым крысам в течение 21 суток не выявила достоверных изменений биохимических и гематологических показателей периферической крови сыворотки крови животных; коэффициенты масс внутренних органов животных и соотношение массы иммунокомпетентных органов (тимус, селезёнка) не имели статистически достоверных отличий от аналогичных показателей у животных в контроле. Полученные результаты позволили сделать вывод об отсутствии токсичности мембраны PLA-Ag и подтвердили безопасность ее применения в клинической практике.

На четвертом этапе исследования проведено изучение влияния разработанной мембраны PLA-Ag на регенерацию костной ткани на модели критического дефекта свода черепа кроликов породы Шиншилла. Экспериментально установлено, что имплантированная мембрана PLA-Ag обеспечивала благоприятные условия для нормальной регенерации плоских костей черепа: на 42 сутки дефект полностью закрывался незрелой костной тканью. Участки соединительной ткани визуализировались в незначительных количествах, преимущественно преобладали костно-хрящевые элементы, подвергающиеся активному процессу преобразования. В единичном количестве встречались хондроциты. В просвете свежесформованных костных блоках наблюдалось значительное количество остеобластов и остеокластов, что говорит об активных процессах ремоделирования кости. По краям раны в наружных слоях все также визуализировалась волокнистая соединительная ткань внушающим количеством фибробластов.

По данным иммуногистохимического исследования костно-мышечного лоскута в контрольной группе PLA (n=4) обнаружена умеренная положительная реакция с антителами к CD3 ($17,3 \pm 5,2\%$) и CD30 ($14,1 \pm 3,6\%$), в том числе в межклеточном матриксе. Маркирование на CD15 показало слабую иммунопозитивную реакцию ($3,4 \pm 1,2\%$). В экспериментальной группе PLA-Ag (n=4) все иммуномаркеры продемонстрировали слабую положительную реакцию:

CD3 ($6,5 \pm 3,1\%$), CD30 ($3,1 \pm 1,4\%$), CD15 ($1,2 \pm 0,5\%$), со статистически достоверным уменьшением числа клеток, иммунопозитивных в отношении CD3 ($p=0,03$) и CD30 ($p=0,01$). Умеренную положительную реакцию на Т-лимфоциты (с антителами к CD3) отмечали в образцах мембран из PLA-Ag и PLA, с тенденцией к ее снижению в последних. Маркирование на активированные Т-лимфоциты (CD30) и нейтрофилы (CD15) показало слабую иммунопозитивную реакцию во всех случаях. Однако в препаратах с мембраной PLA-Ag доля иммунопозитивных клеток была достоверно ниже, чем в препаратах с мембраной PLA без наночастиц серебра ($p > 0,05$).

«Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высокой противомикробной активности покрытия полилактидной мембраны наночастицами Ag при использовании в качестве их источника коллоидного раствора наночастиц» [100; 105; 109]. Уменьшение доли CD3+ и CD30+ клеток демонстрирует снижение активности воспалительного ответа на инородное тело, в особенности со стороны активированных лимфоцитов. Миграция в область дефекта макрофагов и нейтрофилов также происходила менее активно в экспериментальной группе PLA-Ag, хотя снижение уровня CD15-иммунопозитивности не достигло статистической значимости. Данная картина наряду с уменьшением выраженности фиброобразования в виде формирования организованной капсулы свидетельствует о подавлении воспалительной реакции на всех этапах ее развития.

Таким образом, использование раствора коллоидного Ag для покрытия наночастицами полилактидных мембран имеет хороший потенциал в качестве противомикробного и противовоспалительного агента. «Кроме того, морфологическая картина в микропрепаратах, соответствующих 14-м суткам после операции, свидетельствовала о значительно более ранней индукции аутолиза костных отломков и о быстром затухании воспалительного процесса в очаге повреждения в сравнении с мембраной без наночастиц серебра (PLA-FR), где к данному сроку по краям дефекта все еще отмечались признаки дистрофических изменений тканей, выявлялись отдельные участки лимфогистиоцитарной

инфильтрации и небольшие очаги некротизированной костной ткани. Результаты гистологического и иммуногистохимического исследования подтвердили целесообразность использования мембраны PLA-FR-Ag при костнопластических операциях в силу выраженного антимикробного и противовоспалительного действия, способствующего быстрому затуханию воспалительного процесса в очаге повреждения» [24] и, как следствие, ускорению последующей активации процессов регенерации костной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Для медицинского применения разработана методика нанесения гидрозоля наночастиц Ag на мембрану из полилактида, основанная на погружении мембраны в раствор гидрозоля «НанАргол» с концентрацией наночастиц Ag 0,2 мг/мл до состояния полного впитывания.
2. Для создания мембраны с антимикробными свойствами использовался раствор гидрозоля наночастиц серебра в концентрации 0,2 мг/мл, который не обладает токсическим действием, что доказывается в тесте на выживаемость рачков *Daphnia magna* Straus, а также инкубации с клеточными культурами *in vitro* и в эксперименте на животных *in vivo*.
3. Установлена сохранность свойств мембраны в физиологическом 0,9 мас. % растворе NaCl, имитирующем свойства сыворотки крови более 14 суток.
4. Показана высокая антибактериальная активность в отношении клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и удовлетворительную в отношении штаммов *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекционными осложнениями после установки стоматологических имплантатов.
5. Доказана высокая биосовместимость и цитокондуктивность на примере клеток соединительной ткани фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ). Клетки ФЭЧ активно колонизировались на поверхности и внутри мембраны с увеличением времени инкубации; исследование структуры клеток на поверхности мембраны методом атомно-силовой микроскопии показало, что в процессе роста клетки ФЭЧ уплощались, одновременно занимая большую площадь поверхности;
6. Использование мембраны, обработанной гидрозолем наночастиц серебра в концентрации 0,2 мг/мл, способствует снижению выраженности воспалительной реакции в области операционной раны и, тем самым, приводит к оптимизации репаративного процесса остеогенеза костной ткани, что доказывается ускорением сроков построения регенерата в области экспериментальных дефектов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Остеопластическую мембрану PLA-FR-Ag из «полилактид-фиброина» (полилактид – 50% + шелк – 50%) с наночастицами Ag рекомендуется использовать для закрытия интраоперационных костных дефектов при костнопластических операциях в силу выраженного антимикробного и противовоспалительного действия.
2. Для изготовления барьерной мембраны для направленной костной регенерации с антибактериальными свойствами рекомендовано использование гидрозоля наночастиц Ag с концентрацией 0,2 мг/мл.
3. Перед клиническим применением рекомендуется погрузить барьерную мембрану в коллоидный раствор наночастиц Ag с концентрацией 0,2 мг/мл до ее полного пропитывания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГАП – гидроксиапатит

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

НЧ – наночастицы

НЧ Ag – наночастицы серебра

ПМК – полимолочная кислота

РЭМ – растровая электронная микроскопия

ФЭЧ – фибробласты эмбрионов человека

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

AgNO₃ – нитрат серебра

ВОИ – базально остеоинтегрированные имплантаты

EtBr – бромистый этидий

FDA – флуоресцеиндиацетат

KNO₃ – нитрат калия

NaCl – хлорид натрия

PLA-FR – мембрана из полилактида и фиброина шелка

PLA-FR-Ag – мембрана из полилактида и фиброина шелка с нанесенными на нее наночастицами Ag

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаева, Л.Ф. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра / Л.Ф. Абаева, В.И. Шумский, Е.Н. Петрицкая, Д.А. Рогаткин, П.Н. Любченко // Альманах клинической медицины. – 2010. – № 22. – С. 10–16.
2. Абу Бакер Кефех Фархи. Применение биорезорбируемой мембраны «Пародонкол» для оптимизации заживления дефекта челюсти после цистэктомии. Экспериментальное исследование: дис. ... канд. мед. наук / Абу Бакер Кефех Фархи. – Москва, 2001. – 132 с.
3. Азарова, Е.А. Клинико-экспериментальное обоснование применения «Биопласт-дент», «Клипдент» в комплексном лечении переломов челюстей и внутрикостных образований челюстно-лицевой области: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.14 / Азарова Екатерина Александровна. – Воронеж, 2015. – 144 с.
4. Александрова, Г.П. Патент RU 2278669. Средство, обладающее антимикробной активностью / Г.П. Александрова, Л.А. Грищенко, Т.В. Фадеева, С.А. Медведева, Б.Г. Сухов, Б.А. Трофимов. Опубл. 27.06.2006.
5. Алиев, А.М. Обоснование применения дентальной имплантации в комплексе лечения пациентов с дефектами зубных рядов (обзор литературы) / А.М. Алиев // Молодой ученый. – 2016. – № 26 (130). – С. 193–196.
6. Ашман, А. Вживление имплантантов в челюстные отростки после заполнения костного гребня синтетическим костным трансплантатом Bioriant-NTR. Часть 2. Ретроспективное 12-летнее гистологическое исследование / А. Ашман, И. Лопинто // Клиническая стоматология. – 2002. – № 2. – С. 34–40.
7. Бабушкина, И.В. Наночастицы металлов в лечении экспериментальных гнойных ран / И.В. Бабушкина // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7. – № 2. – С. 530–533.
8. Базилян, Э.А. Направленная тканевая регенерация в дентальной имплантологии / Э.А. Базилян, Б.С. Смбатьян // Клиническая стоматология. – 2008. – № 3 (47). – С. 42–50.

9. Баринов, С.М. Биокерамика на основе фосфатов кальция [Текст] / С.М. Баринов, В.С. Комлев. – Москва: Наука, 2005. – 204 с.
10. Беспальчук, А.П. Использование деминерализованных костных трансплантатов в лечении солитарных энхондром кисти / А.П. Беспальчук // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2004. – № 4 (8). – С. 45–49.
11. Богатырев, В.А. Методы синтеза наночастиц с плазменным резонансом. Пособие / В.А. Богатырев, Л.А. Дыкман, Г.Г. Хлебцов Н.Г. – Саратов: Изд-во Саратовского гос. ун-та. – 2009. – 35 с.
12. Борисенко, А.В. Экспериментальное обоснование применения препаратов нанозолота для лечения заболеваний пародонта / А.В. Борисенко, О.Б. Ткач, О.В. Линовицкая, А.П. Левицкий // Стоматолог-практик. – 2014. – № 1(239). – С. 58–62.
13. Борисенко, А.В. Влияние оральных аппликаций силикагеля, содержащего наночастицы золота или серебра на степень дисбиоза десны крыс после воздействия липополисахарида / А.В. Борисенко, О.Б. Ткач, А.П. Левицкий // Вестник стоматологии. – 2013. – № 3 (84). – С. 2–4.
14. Борисова, Э.Г. Опыт применения препарата «Биопласт-Дент» для лечения заболеваний пародонта / Э.Г. Борисова, А.В. Потоцкая // Стоматолог-практик. – 2017. – № 1. – С. 8–10.
15. Бочарова, И. Г. Восстановление костной ткани альвеолярного отростка при перфорации верхнечелюстного синуса в условиях направленной тканевой регенерации: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / Бочарова Инна Геннадьевна. – Воронеж, 2008. – 139 с.
16. Бурмистров, В.А. Новый серебросодержащий препарат «Аргоника» / В.А. Бурмистров, О.Г. Симонова // Сборник трудов по материалам научно-практической конференции «Серебро и висмут в медицине». – Новосибирск, 2005. – С. 195–204.

17. Волков, А.В. Морфология репаративного остеогенеза и остеointegrации в челюстно-лицевой хирургии: дис. ... док. мед. наук: 14.03.02 / Волков Алексей Вадимович. – Москва, 2018. – 261 с.

18. Волков, А.В. Влияние противовоспалительных препаратов на регенерацию костной ткани при трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / А.В. Волков, Е.Н. Антонов, А.В. Васильев [и др.] // Биомедицина. – 2014. – № 4 (1). – С. 17–24.

19. Волков, А.В. Регенерация костей черепа взрослых кроликов при имплантации коммерческих остеоиндуктивных материалов и трансплантации тканеинженерной конструкции / А.В. Волков, И.С. Алексеева, А.А. Кулаков [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 2. – С. 72–77.

20. Володина, Д.Н. Клинико-экспериментальное обоснование применения остеопластического материала на основе костного недеминерализованного коллагена, насыщенного сульфатированными гликозаминогликанами в хирургической стоматологии: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21; 14.00.15 / Володина Дарья Николаевна. – Москва, 2008. – 127 с.

21. Воложин, А.И. Особенности тканевой реакции при имплантации инъекционного полиакриламидного геля, содержащего ионы серебра и гидроксиапатит / А.И. Воложин, А.Б. Шехтер, Т.Х. Агнокова [и др.] // Стоматология. – 2000. – Т. 79. – № 6. – С. 11–15.

22. Гаджиев, С.А. Хирургические реконструктивные операции на альвеолярном отростке при предортопедической подготовке больных / С.А. Гаджиев, Т.К. Хамраев // Стоматология. – 1993. – Т. 72. – № 4. – С. 88–93.

23. Гладких, П.Г. Эффект наночастиц серебра в отношении биопленок микроорганизмов (литературный обзор) / П.Г. Гладких // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2015. – № 1. – С. 3–4.

24. Грудянов, А.И. Значение искусственных мембран в решении проблемы направленной регенерации тканей / А.И. Грудянов, О.А. Фролова, С.Б. Десятник // Новое в стоматологии. – 1996. – № 4. – С. 3–9.

25. Гурин, А.Н. Карбонатгидроксиапатит как фактор структурно-функциональной организации минерализованных тканей в норме и патологии. Перспективы применения в костно-пластической хирургии / А.Н. Гурин, Н.А. Гурин, Ю.А. Петрович // Стоматология. – 2009. – Т. 88. – № 2. – С. 76–79.

26. Гусев, С.А. Система отбора перспективных имплантируемых трехмерных полимерных материалов для тканевой инженерии / С.А. Гусев, П.А. Щеплев, Н.Н. Гарин, Г.Г. Борисенко // Перспективные материалы. – 2005. – № 6. – С. 49–56.

27. Диланян, М.Х. Патофизиологическое обоснование применения остеопластического материала NORIAN CRS с одномоментной дентальной имплантацией (экспериментально-клиническое исследование): дисс. ... канд. мед. наук: 14.03.03; 14.01.14 / Диланян Мамикон Хачатурович. – Москва, 2014. – 118 с.

28. Добрякова, О.Б. Аугментационная маммопластика силиконовыми эндопротезами [Текст] / О.Б. Добрякова, Н.Н. Ковынцев. – Москва: МОК ЦЕНТР, 2000. – 148 с.

29. Долгалев, А.А. Методы коррекции альвеолярного отростка биокерамическими материалами при дентальной имплантации / А.А. Долгалев, В.И. Гречишников, Н.Н. Заплешко // Проблемы стоматологии и нейростоматологии. – 1999. – № 2. – С. 31–35.

30. Долгалев, А.А. Обоснование дифференцированного применения имплантационных материалов в стоматологии: дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.21 / Долгалев Александр Александрович. – Москва, 2009. – 235 с.

31. Дробышев, А.Ю. Лечение больных с генерализованной формой пародонтита с применением хирургических, ортодонтических и ортопедических методов / А.Ю. Дробышев, В.С. Агапов, Л.С. Персин, Н.Н. Дробышева // Институт стоматологии. – 2002. – № 3 (16). – С. 40–41.

32. Дяченко, Н.П. Исследование интенсивности конвективной пеносушки желатинового бульона из отходов переработки рыб частиковых пород / Н.П. Дяченко, Као Тхи Хуе, Э.П. Дяченко, Ю.А. Максименко // Вестник Астраханского

государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2019. – № 1. – С. 136–144.

33. Дяченко, Н.П. Разработка рациональных режимов сушки желатинового бульона из отходов переработки рыбы / Н.П. Дяченко, Ю.А. Максименко, Э.П. Дяченко // Вестник Астраханского государственного технического университета. – 2019. – № 1 (67). – С.30–36.

34. Ефимов, Ю.В. Хирургическое лечение околокорневых кист челюстей / Ю.В. Ефимов // Стоматология. – 1993. – Т. 72. – № 3. – С. 25–27.

35. Жданов, Е.В. Клинико-морфологические результаты восстановления альвеолярных дефектов с применением коронкальных нижнечелюстных трансплантатов из ретромолярной области / Е.В. Жданов, Г.Н. Берченко // Пародонтология. – 2009. – № 3 (52). – С. 32–37.

36. Жданов, Е.В. Новый подход к хирургической подготовке и ортопедическому лечению пациентов с полной потерей зубов и выраженной альвеолярной атрофией / Е.В. Жданов, А.В. Хватов, И.В. Корогодин // Клиническая стоматология. – 2009. – № 2 (50). – С. 64–68.

37. Жолудев, С.Е. Современные знания и клинические перспективы использования для позиционирования дентальных имплантатов хирургических шаблонов (обзор литературы) / С.Е. Жолудев, П.М. Нерсесян // Проблемы стоматологии. – 2017. – Т. 13. – № 4. – С. 74–80.

38. Жук, А.О. Эффективность применения внутрикостных имплантатов при раннем удалении первых постоянных моляров: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / Жук Андрей Олегович. – Волгоград, 2007. – 161 с.

39. Иванов, П.В. Клиническое обоснование применения ксеноперикардальной пластины Кардиоплант в качестве резорбируемой мембраны в амбулаторной стоматологической практике / П.В. Иванов, Н.В. Булкина, Г.А. Капралова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – Т. 20. – № 2. – С. 77–80.

40. Иванов, С.Ю. Имплантация при множественной и полной адентии у детей с гипогидротической эктодермальной дисплазией / С.Ю. Иванов, Н.В.

Бондарец, О.Б. Ненадова // Материалы VII конференции челюстно-лицевых хирургов и стоматологов (Россия, Санкт-Петербург 2002). – Санкт-Петербург, 2002. – С. 65–66.

41. Иванов, С.Ю. Использование биокомпозиционного остеопластического материала "Алломатрикс-имплант" при хирургическом лечении воспалительных заболеваний пародонта / С.Ю. Иванов, Г.В. Кузнецов, Р.К. Чайлахян [и др.] // Пародонтология. – 1999. – № 4 (29). – С. 39–43.

42. Иванов, С.Ю. К вопросу об использовании дентальных имплантатов при ортодонтическом лечении взрослых / С.Ю. Иванов, Л.В. Польша, М.В. Ломакин, А.А. Мураев // Российский вестник дентальной имплантологии. – 2004. – № 1 (5). – С. 34–39.

43. Иванов, С.Ю. Применение дентальных имплантации у детей и подростков при олигодентии / С.Ю. Иванов, О.Б. Ненадова, Н.В. Самойлова // Материалы научно-практической конференции. – Рязань, 2003. – С. 47–48.

44. Иванов, С.Ю. Разработка и доклинические исследования изолирующей мембраны на основе сополимера поли-3-оксибутирата-со-3-оксивалерата для направленной костной регенерации / С.Ю. Иванов, А.П. Бонарцев, Ю.Ж. Гажва [и др.] // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61. – № 6. – С. 717–723.

45. Иванов, С.Ю. Синтетические материалы, используемые в стоматологии для замещения дефектов костной ткани / С.Ю. Иванов, Р.Ф. Мухаметшин, А.А. Мураев [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 1. – С. 60.

46. Иорданишвили, А.К. Экспериментальная оценка эффективности применения «Коллапана», «Алломатрикс-импланта» и пористой алюмооксидной керамики для пластики костных дефектов / А.К. Иорданишвили, В.Г. Гололобов, Д.Н. Усиков // Институт стоматологии. – 2006. – № 1 (30). – С. 104–105.

47. Ирьянов, Ю.М. Направленный остеогенез при имплантации в полостной дефект кости сетчатых конструкций из никилида титана / Ю.М. Ирьянов, О.В. Дюрягина // Современные технологии медицины. – 2017. – № 9 (2). – С. 68–74.

48. Ирьянов, Ю.М. Остеоинтеграция сетчатых конструкций никелида титана и репаративное костеобразование при их имплантации / Ю.М. Ирьянов, Д.Ю. Борзунов, В.Ф. Чернов [и др.] // Гений ортопедии. – 2014. – № 4. – С. 76–80.
49. Кирилова, И.А. Костнопластические биоматериалы и их физико-механические свойства / И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная, Е.В. Легостаева [и др.] // Хирургия позвоночника. – 2010. – № 1. – С. 81–87.
50. Киселева, А.Ю. Бактерицидные текстильные материалы на основе биологически активных препаратов и наносеребра / А.Ю. Киселева, И.А. Шушина, О.В. Козлова, Ф.Ю. Телегин // Известия высших учебных заведений. Технология легкой промышленности. – 2011. – Т. 12. – № 2. – С. 110–112.
51. Конюченко, Е.А. Цитологическая оценка динамики репаративных процессов в экспериментальной условно асептической ране под действием комплексного препарата на основе хитозана и наночастиц металлов / Е.А. Конюченко, Л.Ф. Жандарова, И.В. Бабушкина [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 629–632.
52. Коротеев, А.А. Экспериментальное обоснование применения нового остеопластического геля на основе коллагена и гидроксиапатита с неколлагеновыми белками кости для заполнения костных дефектов челюстей: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / Коротеев Александр Александрович. – Москва, 2007. – 141 с.
53. Коротких, Н.Г. Клиническое применение материала «Биопласт-дент» при заполнении дефектов челюстных костей / Н.Г. Коротких, Д.Ю. Харитонов, Е.А. Азарова // Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. – 2014. – № 55. – С. 59–63.
54. Коротких, Н.Г. Комплексная профилактика деформаций альвеолярного отростка после удаления зубов / Н.Г. Коротких, Н.Н. Лесных // Стоматология. – 2004. – Т. 83. – № 1. – С. 23.
55. Коротких, Н.Г. Обоснование применения остеопластических препаратов «Биопласт-дент» и «Клипдент» в эксперименте / Н.Г. Коротких, Д.Ю. Бугримов, И.Н. Лесникова, Е.А. Азарова // Сборник материалов 1 международной

конференции «Морфологические аспекты безопасности жизнедеятельности». – Воронеж, 2013. – С. 148.

56. Коротких, Н.Г. Оценка результатов лечения радикулярных кист челюстей с использованием остеопластического материала «Биопласт-дент» / Н.Г. Коротких, Д.Ю. Харитонов, Е.А. Азарова, И.В. Степанов, И.Н. Лесникова // Материалы XIX Международной конференции челюстно-лицевых хирургов и стоматологов «Новые технологии в стоматологии». – Санкт-Петербург, 2014. – С. 69.

57. Коротких, Н.Г. Экспериментальное обоснование использования материалов «Клипидент», «Биопласт-дент» при замещении костных дефектов после травматичного удаления зубов / Н.Г. Коротких, Д.Ю. Харитонов, Е.А. Азарова, И.В. Степанов // Вестник новых медицинских технологий. – 2014. – № 1. – С. 67.

58. Коротких, Н.Г. Экспериментальное обоснование применения «Биопласт-дент» и «Клипидент» в комплексном лечении переломов челюстей / Н.Г. Коротких, Е.А. Азарова // Материалы XVIII Международной конференции челюстно-лицевых хирургов и стоматологов «Новые технологии в стоматологии» (г. Санкт-Петербург, 14-16 мая 2013 г.). – Санкт-Петербург, 2013. – С. 90.

59. Кошкин, А.А. Фотоактивные этидиевые и азидоэтидиевые красители. Синтез, свойства и ковалентное присоединение к олигодезоксинуклеотидам / А.А. Кошкин, Т.М. Иванова, Н.В. Булычев [и др.] // Биоорганическая химия. – 1993. – Т.19. – № 5. – С. 570–582.

60. Крутяков, Ю.А. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Ю.А. Крутяков, А.А. Кудринский, А.Ю. Оленин, Г.В. Лисичкин // Успехи химии. – 2008. – Т. 77. – № 3. – С. 242–269.

61. Кулаков, А.А. Клинические аспекты увеличения объема костной ткани альвеолярного отростка при его атрофии на этапах зубной имплантации / А.А. Кулаков, Л.Н. Федоровская, М.А. Ахмадова // Маэстро стоматологии. – 2001. – № 5. – С. 70–74.

62. Кулаков, А.А. Оценка состояния альвеолярной кости вокруг дентальных имплантатов, установленных после выполнения костнопластических операций, по данным рентгенологического анализа / А.А. Кулаков, А.Г. Надточий, Т.В. Брайловская [и др.] // Медицинский альманах. – 2015. – № 3 (38). – С. 178–180.

63. Леонтьев, В.К. Антибактериальная активность коллоидных растворов металлов и их оксидов по микроорганизмам зубной биопленки / В.К. Леонтьев, И.П. Погорельский, Г.А. Фролов, Я.Н. Карасенков // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная стоматология – эффективность профилактики и лечения. Нанотехнологии в стоматологии» (Россия, Тверь, 27–28.11.2014). – Тверь, 2014. – С. 175–178.

64. Лесникова, И.Н. Клинико-экспериментальное обоснование применения остеопластических материалов «Клипдент», «Биопласт-дент» при заполнении костных дефектов после удаления ретинированных третьих моляров / И.Н. Лесникова, Е.А. Азарова // Вестник морского врача (Севастополь). – 2014. – № 13. – С. 78.

65. Лесникова, И.Н. Морфологическое обоснование применения остеопластических материалов «Биопласт-дент» и «Клипдент» в комплексном лечении переломов челюстей / И.Н. Лесникова, Е.А. Азарова // Материалы VIII межрегиональной научно-практической конференции «Современные технологии лечения стоматологических заболеваний» (г. Рязань, 7-8 ноября 2013 г.). – Рязань, 2013. – С. 172–175.

66. Лиознер, Л.Д. Условия регенерации органов у млекопитающих [Текст] / [Л.Д. Лиознер, Т.Б. Тимашкевич, В.Ф. Сидорова и др.]; под ред. Л.Д. Лиознера; Академия медицинских наук СССР. – Москва, 1972. – 328 с.

67. Лиознер, Л.Д. Основные проблемы учения о регенерации [Текст] / Л.Д. Лиознер. – Москва: Наука, 1975. – 103 с.

68. Логинова, Н.К. Жевание. Пособие для врачей / Н.К. Логинова. – М. – 1994. – 30 с.

69. Лосев, В.Ф. Костная пластика альвеолярного отростка верхней челюсти с использованием направленной тканевой регенерации и операции поднятия дна гайморовой пазухи / В.Ф. Лосев // *Стоматология*. – 2009. – Т. 88. – № 1. – С. 54–57.
70. Лосев, В.Ф. Применение пористого минералнаполненного полилактида с мезенхимальными стромальными клетками костного мозга для стимуляции остеогенеза: экспериментальное исследование: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21; 14.00.16 / Лосев Владимир Федорович. – Москва, 2009. – 105 с.
71. Лосев, Ф.Ф. Новое в имплантологии – биологические мембраны и их возможности / Ф.Ф. Лосев, А.Н. Шарин // *Стоматология для всех*. – 1999. – № 1. – С. 14–15.
72. Лукиных, Л.М. Верхушечный периодонтит / Л.М. Лукиных, Ю.Н. Лившиц // Н. Новгород: Изд-во НГМА, 1999. – 92 с.
73. Любченко, А.В. Изучение репаративных процессов костной ткани крыс с использованием остеотропного материала «Клипдент ПЛ» и мембраны «Клипдент МК» компании «ВЛАДМИВА», Россия (экспериментально-морфологическое исследование) / А.В. Любченко, Н.С. Кравцов, В.Ф. Посохова [и др.] // *Институт стоматологии*. – 2018. – № 32 (79). – С. 104–105.
74. Майбородин, И.В. Изменения тканей и регионарных лимфатических узлов крыс при хроническом воспалительном процессе в условиях введения интерлейкина-2 / И.В. Майбородин, Д.В. Егоров, Т.М. Родишева [и др.] // *Морфология*. – 2011. – Т. 139. – № 1. – С. 43–48.
75. Майбородин, И.В. Морфологические изменения тканей после имплантации упругих пластинчатых инородных тел в эксперименте / И.В. Майбородин, А.И. Шевела, В.А. Матвеева [и др.] // *Морфология*. – 2012. – Т. 141. – № 2. – С. 54–60.
76. Майбородин, И.В. Отсутствие полной резорбции полилактидного материала в организме / И.В. Майбородин, И.В. Кузнецова, Е.А. Береговой [и др.] // *Новости хирургии*. – 2014. – Т. 22. – № 1. – С. 26–32.

77. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая [Текст] / Под ред. А.Н. Миронова. – Москва: Гриф и К, 2013. – 485 с.

78. Митрошенков, П.Н. Сравнительная оценка эффективности пластики тотальных и субтотальных дефектов верхней и средней зон лица с использованием перфорированных экранов из титана и костных аутооттрансплантатов / П.Н. Митрошенков // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.* – 2007. – № 4. – С. 32–45.

79. Михайловский, А.А. Клинико-рентгенологические особенности регенерации тканей после аугментации лунки удаленного зуба с помощью различных остеопластических материалов и мембран / А.А. Михайловский, А.А. Кулаков, В.М. Королев, О.Ю. Винниченко // *Стоматология.* – 2014. – Т. 93. – № 4. – С. 37–40.

80. Мураев, А.А. Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия / А.А. Мураев, А.П. Бонарцев, Ю.В. Гажва [и др.] // *Современные технологии в медицине.* – 2016. – Т. 8. – № 4. – С. 42–50.

81. Невров, А.Н. Хирургическое лечение тяжелых форм пародонтита с применением биокомпозиционного материала «Коллапан» (экспериментально-клиническое исследование): дис. ...канд. мед. наук: 14.00.21 / Невров Александр Николаевич. – Москва, 2002. – 170 с.

82. Новочадов, В.В. Ремоделирование костной ткани в условиях эндогенной интоксикации / В.В. Новочадов, Н.М. Гайфуллин, Д.М. Фролов, А.В. Бачурин // *Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11. Естественные науки.* – 2012. – № 2 (4). – С. 4–10.

83. Носов, В.В. Реконструкция верхней челюсти для зубной имплантации: дис. ... канд. мед. наук: 14.0.21 / Вадим Вячеславович Носов. – Москва, 2005. – 88 с.

84. Нуритдинов, Р.М. Сокращение сроков регенерации костной ткани альвеолярного отростка челюстей с использованием наночастиц серебра / Р.М.

Нуритдинов, И.М. Юлдашев // Институт стоматологии. – 2017. – № 3 (76). – С. 102–103.

85. Огородников, М.Ю. Клинико-лабораторное обоснование увеличения межальвеолярного расстояния у больных с частичным снижением окклюзионной высоты: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / Огородников Михаил Юрьевич. – Москва, 1998. – 116 с.

86. Ожелевская, С.А. Применение неколлагеновых белков кости в составе материала Гапкол, модифицированного вакуумной обработкой, для оптимизации регенерации челюсти в эксперименте: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / Ожелевская Светлана Анатольевна. – Москва, 2007. – 132 с.

87. Павлова, Т.В. Морфофункциональное состояние костной ткани при введении коллагеново-гидроксиапатитных нанокompозитов / Т.В. Павлова, Ю.А. Мезенцев, Л.А. Павлова [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2009. – № 4 (59). – С. 28–33.

88. Панарин, Е.Ф. Биологически активные полимерные наносистемы // Тезисы докладов Международной научной конференции «Современные тенденции развития химии и технологии полимерных материалов». – СПб.: ФГБОУВПО «СПГУТД», 2015. – С. 78–80.

89. Панкратов, А.С. Лечение больных с переломами нижней челюсти с использованием «Остим-100» (гидроксиапатита высокой дисперсности) как стимулятора репаративного остеогенеза: дис. ... канд. мед. наук / Панкратов Александр Сергеевич. – Москва, 1994. – 169 с.

90. Плескова, С.Н. Исследование биосовместимости наночастиц с флуоресцентным центром Er/Yb в системе с нейтрофильными гранулоцитами / С.Н. Плескова, Е.Н. Горшкова, Э.Р. Михеева, А.Н. Шушунов // Цитология. – 2011. – Т. 53. – № 5. – С. 444–449.

91. Плотников, Н.А. Костная пластика нижней челюсти / Н.А. Плотников. – М.: Медицина, 1979.

92. Помогайло, А.Д. Металлосодержащие нанокompозиты с контролируемой молекулярной архитектурой / А.Д. Помогайло // Российский химический журнал. – 2002. – Т. 46. – № 5. – С. 64.
93. Помогайло, А.Д. Наночастицы металлов в полимерах // А.Д. Помогайло, А.С. Розенберг, И.Е. Уфлянд. – Москва: Химия, 2000. – 671 с.
94. Попов, В.К. Лазерные технологии изготовления индивидуальных имплантатов и матриц для тканевой инженерии / В.К. Попов, А.В. Евсеев, Е.Н. Антонов [и др.] // Оптический журнал. – 2007. – Т. 74. – № 9. – С. 73–79.
95. Попов, В.Ф. Зубное протезирование с использованием имплантации при выраженной атрофии альвеолярных отростков челюстей: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / Попов Владимир Федорович. – Самара, 2009. – 22 с.
96. Рединов, И.С. Подготовка тканей протезного поля при ортопедическом лечении больных с беззубой нижней челюстью при резко выраженной атрофии альвеолярной части: дис. ... док. мед. наук: 14.00.21 / Рединов Иван Семенович. – Ижевск, 2000. – 236 с.
97. Ризванов, И.Р. Костная гетеропластика альвеолярных отростков как подготовка челюстных костей к внутрикостной имплантации / И.Р. Ризванов, И.Д. Киняпина // Актуальные аспекты стоматологии: Сб. науч. работ – Н. Новгород. – 1998. – С. 90–92.
98. Русаков, А.В. Регенерация из костной стружки в эксперименте / А.В. Русаков // Вестник хирургии. – 1955. – Т. 75. – № 5. – С. 15–23.
99. Рыжова, И.П. Оптимизация метода лечения стоматологических больных с постэкстракционными дефектами челюстей / И.П. Рыжова, Е.В. Милова, И.Г. Бочарова // Сборник трудов 71-й научной конференции КГМУ и сессии Центрально-Черноземного научного центра РАМН. – Курск: КГМУ, 2006. – Т. 1.– С. 339–340.
100. Савин, Е.И. Экспериментальное исследование антибактериальной активности наночастиц серебра на модели перитонита и менингоэнцефалита *in vivo* / Е.И. Савин, Т.И. Субботина, А.А. Хадарцев [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2014. – №1. – С. 35.

101. Самсонов, В.Е. Брефокостная пластика альвеолярного отростка челюсти перед эндооссальной имплантацией / В.Е. Самсонов, А.П. Иванов, В.И. Медвецкий [и др.] // Новое в стоматологии. – 1996. – Т. 43. – № 2. – С. 19–21.

102. Сойфер, В.В. Тканевая реакция на дентальные имплантаты при использовании их в сочетании с остеопластическим гелем в эксперименте / В.В. Сойфер, В.М. Ткаченко // Труды XVI и XV Всероссийской научно-практической конференции и Труды X съезда Стоматологической ассоциации России. – Москва, 2005. – С. 146–148.

103. Сойфер, В.В. Экспериментальное обоснование эффективности применения остеоинтегративного геля при немедленной дентальной имплантации / В.В. Сойфер, А.И. Воложин, В.В. Рогинский, В.В. Гемонов // Стоматология для всех. – 2005. – № 2. – С. 44–47.

104. Саломатина, Е.В. Наноккомпозиты на основе хитозана и сополимеров полититаноксида с гидроксиэтилметакрилатом, содержащие наночастицы золота и серебра: дис. ... кан. хим. наук: 02.00.06 / Саломатина Евгения Владимировна. – Нижний Новгород, 2015. – 204 с.

105. Таусарова, Б.Р. Антибактериальные свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Б.Р. Таусарова, А.Ж. Кутжанова, М.Ш. Сулейменова [и др.] // Вестник Алматинского технологического университета. – 2014. – № 1. – С. 76–83.

106. Темерханов, Ф.Т. Неинвазивный метод определения плотности костной ткани альвеолярных отростков челюстей в местах последующей имплантации / Ф.Т. Темерханов, В.В. Щетинин, С.Л. Архаров // Казанский вестник стоматологии. – 1996. – № 2. – С. 132–137.

107. Тер-Асатуров, Г.П. Экспериментальное изучение эффективности клинического применения перфооста при замещении дефектов и коррекции деформаций опорных тканей лица / Г.П. Тер-Асатуров, М.В. Лекишвили // Стоматология. – 2009. – Т. 88. – № 4. – С. 17–22.

108. Трезубов, В.Н. Комплексное возмещение утраченных частей альвеолярных отростков верхней и нижней челюсти / В.Н. Трезубов, М.М.

Соловьев, Г.Е. Афиногенов [и др.] // Сборник материалов конференции «Биомедицина и ближайшие проблемы интегративной антропологии». – СПб., 1998. – Вып. 2. – С. 237–240.

109. Трезубов, В.Н. Создание антибактериального материала, содержащего наносеребро, для базисов съемных зубных протезов / В.Н. Трезубов, С.С. Семенов, Г.Е. Афиногенов [и др.] // Институт стоматологии. – 2010. – № 2 (47). – С. 22–23.

110. Федорова, М.З. Оценка биоактивности и биосовместимости остеопластического материала в опытах *in vitro* и *in vivo* / М.З. Федорова, С.В. Надеждин, В.Ф. Посохова [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – № 10-3 (129). – С. 124–129.

111. Федяев, И.М. Использование аллогенных костно-тканевых материалов при непосредственной и ранней отсроченной дентальной имплантации / И.М. Федяев, В.Ю. Никольский // Материалы VIII и IX Всероссийской научно-практической конференции и Труды VII съезда Стоматологической ассоциации России. – М., 2002. – С. 191–193.

112. Фионова, Э.В. Анализ репаративных процессов в нижней челюсти при использовании модифицированных остеопластических материалов серии Гапкол с мезенхимальными стромальными клетками в эксперименте: дис. ... кан. мед. наук: 14.00.21 / Фионова Элина Викторовна. – Москва, 2008. – 108 с.

113. Федурченко, А.В. Клинико-экспериментальное обоснование выбора остеопластического материала для замещения костных дефектов челюстей: дис. ... кан. мед. наук: 14.00.21 / Федурченко Алексей Васильевич. – Ставрополь, 2009. – 160 с.

114. Харитонов, Д.Ю. Оценка данных сканирующей электронной микроскопии при изучении морфологической структуры остеопластического материала «Клипдент» и нижнечелюстной кости человека / Д.Ю. Харитонов, Э.П. Домашевская, Е.А. Азарова, Д.Л. Голощапов // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. – С. 1074.

115. Харитонов, Д.Ю. Сравнение морфологических и структурных характеристик костной ткани человека и остеопластического материала «Биопласт-Дент» / Д.Ю. Харитонов, Э.П. Домашевская, Е.А. Азарова, Д.Л. Голощапов // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 10–7. – С. 1389–1393.
116. Хирургические остеопластические материалы: Биопласт-Дент. Клипдент // [Электронный ресурс]: www.vladmiva.ru. (дата обращения 15.09.2022)
117. Шайхалиев, А.И. Использование новых биокompозитных материалов на основе не-коллагеновых белков, влияющих на остеорепаративный процесс в челюстно-лицевой хирургии и травматологии. Клинический пример / А.И. Шайхалиев, М.С. Краснов, Я.Н. Карасенков [и др.] // *Российский стоматологический журнал*. – 2014. – № 2. – С. 43–45.
118. Шапошников, Ю.Г. Травматология и ортопедия / Руководство для врачей: в 3 томах. Т. 1. Под ред. Ю. Г. Шапошникова. – Москва: Медицина, 1997. – 656 с.
119. Шульгина, Т.А. Изучение антимикробных свойств дисперсных систем на основе наночастиц серебра и меди и обоснование перспектив их использования: дис. ... кан. биол. Наук: 03.02.03 / Шульгина Татьяна Андреевна. – Оболенск, 2015. – 117 с.
120. Эрлих, Г. Нанотехнологии как национальная идея / Г. Эрлих // *Химия и жизнь*. – 2008. – № 3. – С. 32–38.
121. Adell, R. Reconstruction of severely resorbed edentulous maxillae using osseointegrated fixtures in immediate autogenous bone grafts / R. Adell, U. Lekholm, K. Gröndahl [et al.] // *Int J Oral Maxillofac Implants*. – 1990. – № 5 (3). – P. 233–246.
122. Arora, S. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour / S. Arora, J. M. Rajwade, K. M. Paknikar // *Toxicol Appl Pharmacol*. – 2012. – № 258 (2). – P. 151–165.
123. Artzi, Z. Vertical ridge augmentation using xenogenic material support by a configured titanium mesh: clinicohistopatology and histochemical study / Z. Artzi, D. Dayan, Y. Alpern, C.E. Nemcovsky // *Int J Oral Maxillofac Implants*. – 2003. – № 18 (3). – P. 440–446.

124. Assenza, B. Localized ridge augmentation using titanium micromesh / B. Assenza, M. Piattelli, A. Scarano [et al.] // *J Oral Implantol.* – 2001. – № 27 (6). – P. 287–292.

125. Baeke, J.L. Breast deformity caused by anatomical or teardrop implant rotation / J.L. Baeke // *Plast Reconstr Surg.* – 2002. – № 109 (7). – P. 2555–2564.

126. Becker, W. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants / W. Becker, S.E. Lynch, U. Lekholm [et al.] // *J Periodontol.* – 1992. – № 63 (11). – P. 929–940.

127. Becktor, J.P. The influence of mandibular dentition on implant failures in bone-grafted edentulous maxillae / J.P. Becktor, S.E. Eckert, S. Isaksson, E.E. Keller // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 2002. – № 17 (1). – P. 69–77.

128. Benqué, E. Tomodensitometric and histologic evaluation of the combined use of a collagen membrane and a hydroxyapatite spacer for guided bone regeneration: a clinical report / E. Benqué, S. Zahedi, D. Brocard [et al.] // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 1999. – № 14 (2). – P. 258–264.

129. Bottino, M.C. Membranes for Periodontal Regeneration – A Materials Perspective / M.C. Bottino, V. Thomas // *Front Oral Biol.* – 2015. – № 17. – P. 90–100.

130. Bschorer, R. Verwendung des Fibulaspans bei der Kieferkammaugmentation / R. Bschorer, R. Schmelzle // *Mund Kiefer Gesichtschir.* – 1997. – № 1 (5). – P. 276–280

131. Bunge, S.D. Synthesis of coinage-metal nanoparticles from mesityl precursors / S.D. Bunge, T.J. Boyle, T.J. Headley // *Nano Lett.* – 2003. – № 3 (7). – P. 901–905.

132. Buser, D. Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs / D. Buser, B. Hoffman, J.P. Bernard [et al.] // *Clin Oral Implants Res.* – 1998. – № 9 (3). – P. 137–150.

133. Buser, D. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration / D. Buser, U. Bragger, N.P. Lang, S. Nyman // *Clin Oral Implants Res.* – 1990. – № 1 (1). – P. 22–32.
134. Cardaropoli, D. Vertical ridge augmentation with the use of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bovine bone mineral: a case report / D. Cardaropoli // *Int J Periodontics Restorative Dent.* – 2009. – № 29 (3). – P. 289–295.
135. Chavrier, C. Les greffes occluses d'origine mentonniere dans le traitement des cretes minces / C. Chavrier // *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* – 1997. – № 98. – Supl.1. – P. 8–9.
136. Chen, Z. A facile and novel way for the synthesis of nearly monodisperse silver nanoparticles / Z. Chen, L. Gao // *Mater Res Bull.* – 2007. – № 42 (9). – P. 1657–1661.
137. Cheng, W. Size-Dependent Phase Transfer of Gold Nanoparticles from Water into Toluene by Tetraoctylammonium Cations: A Wholly Electrostatic Interaction / W. Cheng, E. Wang // *J Phys Chem B.* – 2004. – № 108 (1). – P. 24–26.
138. Chiapasco, M. Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges / M. Chiapasco, S. Abati, E. Romeo, G. Vogel // *Clin Oral Implants Res.* – 1999. – № 10 (4). – P. 278–288.
139. Coleman D.J. The role of the contractile fibroblast in the capsules around tissue expanders and implants / D.J. Coleman, D.T. Sharpe, I.L. Naylor [et al.] // *Br J Plast Surg.* – 1993. – № 46 (7). – P. 547–556.
140. Colont, C. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects / C. Colont, D.M. Romero, S. Huang, J.A. Helms // *Clin Orthop Related Res.* – 2005. – № 435. – P. 68–78.
141. Cortellini, P. Localized ridge augmentatiton using guided tissue regeneration in humans. A report of nine cases / P. Cortellini, E. Bartolucci, C. Clauser, G.P. Pini Prato // *Clin Oral Implants Res.* – 1993.– № 4 (4). – P. 203–209.

142. Cruz, M. Implant-induced expansion of atrophic ridges for the placement of implants / M. Cruz, C.C. Reis, F.D.F. Mattos // *J Prosthet Dent.* – 2001. – № 85 (4). – P. 377–381.
143. Dahlin, C. Healing of bone defects by guided tissue regeneration / C. Dahlin, A. Linde, J. Gottlow, S. Nyman // *Plast Reconstr Surg.* – 1988. – № 81 (5). – P. 672–676.
144. De Jong, W.H. Tissue response to partially in vitro predegraded poly-L-lactide implants / W.H. De Jong, J. Eelco Bergsma, J.E. Robinson, R.R. Bos // *Biomaterials.* – 2005. – № 26 (14). – P. 1781–1791.
145. Demyashkin G. Immunohistochemical and morphological characteristics of tissues response to polylactic acid membranes with silver nanoparticles / G. Demyashkin, E. Kogan, L. Borozdkin, T. Demura, E. Shalamova, Z. Centroev, I. Ivanova, M. Gevandova, V. Smirnova-Sotmari, S. Kalinin // *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* – 2020. – № 25 (1). – P. e29–e33
146. De Boever, A.L. A one-stage approach for nonsubmerged implants using a xenograft in narrow ridges: report on seven cases / A.L. De Boever, J.A. De Boever // *Int J Periodontics Restorative Dent.* – 2003. – № 23 (2). – P. 169–175.
147. Díaz-Visurraga, J. Metal nanostructures as antibacterial agents / J. Díaz-Visurraga, C. Gutiérrez, C. von Plessing, A. García // In: *Science and Technology Against Microbial Pathogens: Research, Development and Evaluation.* – Badajoz: Formatex. – 2011. – P. 210–218.
148. Ekert, O. Der Oberkifer – das schlechtere Implantatlager? / O. Ekert, M. Kunkel, J. Wegener [et al.] // *Mund Kiefer Gesichtsschr.* – 1999. – № 3 (Suppl 1). – S. 43–47.
149. Eufinger, H. The role of alveolar ridge width in dental implantology / H. Eufinger, S. König, A. Eufinger // *Clin Oral Investing.* – 1997. – № 1 (4). – P. 169–177.
150. Feuille, F. Clinical and histologic evaluation of bone-replacement grafts in the treatment of localized alveolar ridge defects. Part 1: Mineralized freeze-dried bone allograft / F. Feuille, C.I. Knapp, M.A. Brunsvold [et al.] // *Int J Periodontics Restorative Dent.* – 2003. – № 23 (1). – P. 29–36.

151. Fugazzotto, P.A. GBR using bovine bone matrix and resorbable and nonresorbable membranes. Part 1: histologic results / P.A. Fugazzotto // *Int J Periodontics Restorative Dent.* – 2003. – № 2 (4). – P. 361–369.

152. Fukui, N. Bone tissue reaction of nano-hydroxyapatite/collagen composite at the early stage of implantation / N. Fukui, T. Sato, Y. Kuboki, H. Aoki // *Biomed Mater Eng.* – 2008. – № 18 (1). – P. 25–33.

153. Gehrke, S.A. Resorption mechanism of an injectable calcium phosphate bone regeneration cement—radiographic and histological monitoring / S.A. Gehrke // *Implants. Internat Magazine Oral Implantology.* – 2009. – № 3 (10). – P. 1–9.

154. Green, M. Trialkylphosphine oxide/amine stabilised silver nanocrystals – the importance of steric factors and Lewis basicity in capping agents / M. Green, N. Allsop, G. Wakefield, P.J. Dobson, J.L. Hutchison // *J Mater Chem.* – 2002. – № 12 (9). – P. 2671–2674.

155. Grunder, U. A 3-year prospective multicenter follow-up report on the immediate and delayed-immediate placement of implants / U. Grunder, G. Polizzi, R. Goené [et al.] // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 1999. – № 14 (2). – P. 210–216.

156. Gupta, A. Osteo-maturation of adipose-derived stem cells required the combined action of vitamin D₃, beta-glycerophosphate, and ascorbic acid / A. Gupta, D.T. Leong, H.F. Bai [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – № 362 (1). – P. 17–24.

157. Gupta, A.K. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles / A.K. Gupta, M. Gupta // *Biomaterials.* – 2005. – № 26 (13). – P. 1565–1573.

158. Harris, D. Advanced surgical procedures: bone pigmentation / D. Harris // *Dent. Update.* – 1997. – № 24 (8). – P. 332–337.

159. Hauschka, P.V. Osteocalcin: the vitamin K-dependent Ca²⁺-binding protein of bone matrix / P.V. Hauschka // *Haemostasis.* – 1986. – № 16 (3–4). – P. 258–272.

160. Hench, L.L. Third-generation biomedical materials / L.L. Hench, J.M. Polak // *Science.* – 2002. – № 295 (5557). – P. 1014–1017.

161. Ihde, S. Особенности применения базально остеоинтегрированных имплантатов (BOI) в дистальных регионах обеих челюстей при недостаточном количестве вертикальных костных структур / S. Ihde // Новое в стоматологии – 2003. – Т. 3. – № 111. – С. 38–49.

162. Jovanovic, S.A. Long-term functional loading of dental implants in rhBMP-2 induced bone. A histologic study in the canine ridge augmentation model / S.A. Jovanovic, D.R. Hunt, G.W. Bernard [et al.] // Clin Oral Implants Res. – 2003. – № 14 (6). – P. 793–803.

163. Jovanovic, S.A., Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes / S.A. Jovanovic, M. Nevins // Int J Periodontics Restorative Dent. – 1995. – № 15 (1). – P. 56–69.

164. Jung, R.E. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans / R.E. Jung, R. Glauser, P. Schärer [et al.] // Clin Oral Implants. Res. – 2003. – № 14 (5). – P. 556–568.

165. Jung, R.E. A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regeneration around dental implants / R.E. Jung, G.A. Hälg, D.S. Thoma [et al.] // Clin Oral Implants Res. – 2009. – № 20 (2). – P. 162–168.

166. Kahn, A. The use autogenous block graft for augmentation of the atrophic alveolar ridge [Article in Hebrew] / A. Kahn, B. Shlomi, Y. Levy [et al.] // Pefuat Hapch Vehashinayim (1993). – 2003. – № 20 (3). – P. 54–64.

167. Kaufman, E. Localized vertical maxillary ridge augmentation using symphyseal bone cores: a technique and case report / E. Kaufman, P.D. Wang // Int J Maxillofac Implants. – 2003. – № 18 (2). – P. 293–298.

168. Kfir, E. Minimally invasive guided bone regeneration / E. Kfir, V. Kfir, E. Eliav, E. Kaluski // J Oral Implantol. – 2007. – № 33 (4). – P. 205–210.

169. Khan, S.N. The biology of bone grafting / S.N. Khan, F.P. Cammisa Jr, H.S. Sandhu [et al.] // J Am Acad Orthop Surg. – 2005. – № 13 (1). – P. 77–86.

170. Kim E.V. Biocompatibility and Bioresorption of 3D-Printed Polylactide and Polyglycolide Tissue Membranes // E.V. Kim, Y.S. Petronyuk, N.A. Guseynov, S.V. Tereshchuk, A.A. Popov, A.V. Volkov, V.N. Gorshenev, A.A. Olkhov, V.M. Levin, A.B.

Dymnikov, V.E. Rodionov, G.A. Tumanyan, S.G. Ivashkevich, A.P. Bonartsev, L.L. Borozdkin // *Bull Exp Biol Med.* – 2021. – № 170 (3). – P. 356–359.

171. Kim, S.W. Synthesis of monodisperse palladium nanoparticles / S.W. Kim, J. Paark, Y. Jang [et al.] // *Nano Lett.* – 2003. – № 3 – P. 1289.

172. Kola, M.Z. Surgical templates for dental implant positioning: current knowledge and clinical perspectives / M.Z. Kola, A.H. Shah, H.S. Khalil [et al.] // *Niger J Surg.* – 2015. – № 21 (1). – P. 1–5.

173. Kübler, N.R. Comparative studies of sinus floor elevation with autologous or allogeneic bone tissue [Article in German] / N.R. Kübler, C. Will, R. Depprich [et al.] // *Mund Kiefer Gesichtschir.* – 1999. – № 3. – Suppl. 1. – P. S53–S60.

174. Landi, L. Ridge augmentation using demineralized freeze-dried bone allograft with barrier membrane and cortical columns / L. Landi // *Compend Contin Educ Dent.* – 1998. – № 19 (12). – P. 1221–1223.

175. Lang, N.P. Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement / N.P. Lang, C.H. Hämmerrle, U. Brägger [et al.] // *Clin Oral Implants Res.* – 1994. – № 5 (2). – P. 92–97.

176. Lee, C.H. Effect of dual treatment with SDF-1 and BMP-2 on ectopic and orthotopic bone formation / C.H. Lee, M.U. Jin, H.M. Jung [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – № 10 (3). – P. 120–151.

177. Lee, K.J. Direct synthesis and bonding origins of monolayer-protected silver nanocrystals from silver nitrate through in situ ligand exchange / K.J. Lee, Y.I. Lee, I.K. Shim [et al.] // *J Colloid Interface Sci.* – 2006. – № 304 (1). – P. 92–97.

178. Lee, S.W. Membranes for the Guided Bone Regeneration / S.W. Lee, S.G. Kim // *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* – 2014. – № 36 (6). – P. 239–246.

179. Leiggenger, C.S. Influence of copolymer composition of polylactide implants on cranial bone regeneration / C.S. Leiggenger, R. Curtis, A.A. Müller [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – № 27 (2). – P. 202–207.

180. Lekovic V. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes / V. Lekovic, P.M. Camargo, P.R. Klokkevold [et al.] // *J Periodontol.* – 1998. – № 69 (9). – P. 1044–1049.

181. Lekovic, V. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases / V. Lekovic, E.B. Kenney, M. Weinlaender [et al.] // *J Periodontol.* – 1997. – № 68 (6). – P. 563–570.

182. Lorenzoni, M. Treatment of peri-implant defects with guided tissue regeneration. A comparative clinical study with various membranes and bone grafts / M. Lorenzoni, C. Pertl, C. Keil, W.A. Wegscheider // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 1997. – № 13 (5). – P. 639–646.

183. Louis, P.J. Reconstruction of the maxilla and mandible with particulate bone graft and titanium mesh for implant placement / P.J. Louis., R. Gutta, N. Said-Al-Naief, A.A. Bartolucci // *J Oral Maxillofac Surg.* – 2008. – № 66 (2). – P. 235–245.

184. Louis, P.J. Vertical ridge augmentation using titanium mesh / P.J. Louis // *Oral Maxillofacial Surg Clin North Am.* – 2010. – № 22 (3). – P. 353–368.

185. Lozada, J. Clinical radiographic, and histologic evaluation of maxillary bone reconstruction by using a titanium mesh and autogenous iliac graft: a case report / J. Lozada, P. Proussaefs // *J Oral Implantol.* – 2002. – № 28 (1). – P. 9–14.

186. Maiorana, C. Evaluation of the use of iliac cancellous bone and anorganic bovine bone in the reconstruction of the atrophic maxilla with titanium mesh: a clinical and histologic investigation / C. Maiorana, F. Santoro, M. Rabagliati, S. Salina // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 2001. – № 16 (3). – P. 427–432.

187. Makridis, S.D. Reconstruction of alveolar defects before implant placement / S.D. Makridis // *Compend Contin Educ Dent.* – 1997. – № 18 (5). – P. 457–564.

188. Malchiodi, L. Jaw reconstruction with grafted autologous bone: early insertion of osseointegrated implants and early prosthetic loading / L. Malchiodi, A. Quaranta, A. D'Addona [et al.] // *J Oral Maxillofac Surg.* – 2006. – № 64 (8). – P. 1190–1198.

189. Malchiodi, L. Rigid fixation by means of titanium mesh in edentulous ridge expansion for horizontal ridge augmentation in the maxilla / L. Malchiodi, A. Scarano, M. Quaranta, A. Piattelli // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 1998. – № 13 (5). – P. 701–705.

190. Maridati, P. Histologic and Radiographic Comparison of Bone Scraper and Trephine Bur for Autologous Bone Harvesting in Maxillary Sinus Augmentation / P. Maridati, C. Dellavia, G. Pellegrini [et al.] // *Int J Oral Maxillofac Implants*. – 2015. – № 30 (5). – P. 1128–1136.

191. Marx, R.E. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts / R.E. Marx, E.R. Carlson, R.M. Eichstaedt [et al.] // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. – 1998. – № 85 (6). – P. 638–646.

192. Matsui, Y. Alveolar bone graft for patients with cleft lip/palate using bone particles and titanium mesh: A quantitative study / Y. Matsui, M. Ohta, K. Ohno, M. Nagumo // *J Oral Maxillofac Surg*. – 2006. – № 64 (10). – P. 1540–1545.

193. Matsuzaka, K. Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration: observations by immunohistochemistry and confocal laser scanning microscopy / K. Matsuzaka, M. Shimono, T. Inoue // *Bull Tokyo Dent Coll*. – 2001. – №42 (4). – P. 225–234.

194. McKibbin, B. The biology of fracture healing in long bones / B. McKibbin // *J Bone Joint Surg Br*. – 1978. – № 60-B (2). – P. 150–162.

195. Mccall, R.A. Influence of residual ridge resorption patterns on fixture placement and tooth position, Part III: Presurgical assessment of ridge augmentation requirements / R.A. Mccall, A.L. Rosenfeld // *Int J Periodontics Restorative Dent*. – 1996. – № 16 (4). – P. 322–337.

196. Mercier, P. Bone density and serum minerals in cases of residual alveolar ridge atrophy / P. Mercier, S. Inoue // *J Prosthet Dent*. – 1981. – № 46 (3). – P. 250–255.

197. Misch, С.М. Методика наращивания альвеолярного гребня с помощью костного аутотрансплантата, полученного из ветвей нижней челюсти с целью установки дентальных имплантатов / С.М. Misch // *Институт стоматологии*. – 1999. – № 5. – С. 42–47.

198. Nagao, H. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in alveolar ridge defects in dogs / H. Nagao, N. Tachikawa, T. Miki [et al.] // *Int J Oral Maxillofac Surg*. – 2002. – № 31 (1). – P. 66–72.

199. Nevins, M. Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: a combination of allograft and the GORE-TEX membrane / M. Nevins, J.T. Mellonig // *Int J Periodontics Restorative Dent.* – 1992. – № 12 (2). – P. 96–111.
200. Nevins, M. Implants in regenerated bone: long-term survival / M. Nevins, J.T. Mellonig, D.S. Chem [et al.] // *Int J Periodontics Restorative Dent.* – 1998. – № 18 (1). – P. 34–45.
201. Nocini, P.F. Simultaneous bimaxillary alveolar ridge augmentation by a single free fibular transfer: a case report / P.F. Nocini, G. De Santis, A. Bedogni, L. Chiarini // *J Craniomaxillofac Surg.* – 2002. – № 30 (1). – P. 46–53.
202. Oikarinen, K.S. Augmentation of the narrow traumatized anterior alveolar ridge to facilitate dental implant placement / K.S. Oikarinen, G.K. Sándor, V.T. Kainulainen, M. Salonen-Kemppi // *Dent Traumatol.* – 2003. – № 19 (1). – P. 19–29.
203. Oldberg, A. The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein / A. Oldberg, A. Franzén, D. Heinegård // *J Biol Chem.* – 1988. – № 263 (36). – P. 19430–19432.
204. Palti, A. A concept for the treatment of various dental bone defects / A. Palti, T. Hoch // *Implant Dent.* – 2002. – № 11 (1). – P. 73–78.
205. Panacek, A. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity / A. Panacek, L. Kvítek, R. Prucek [et al.] // *J Phys Chem B.* – 2006. – № 110 (33). – P. 16248–16253.
206. Panigrahi, S. General method of synthesis for metal nanoparticles / S. Panigrahi, S. Kundu, S. Ghosh [et al.] // *J Nanopart Res.* – 2004. – № 6 (4). – P. 411–414.
207. Park, S.Y. The effect of non-resorbable membrane on buccal bone healing at an immediate implant site: an experimental study in dogs / S.Y. Park, S.B. Kye, S.M. Yang, S.Y. Shin // *Clin Oral Implants Res.* – 2011. – № 22 (3). – P. 289–294.
208. Pastoriza-Santos, I. Binary cooperative complementary nanoscale interfacial materials. Reduction of silver nanoparticles in DMF. Formation of monolayers and stable colloids / I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán // *Pure Appl Chem.* – 2000. – № 72 (1–2). – P. 83–90.

209. Peleg, M. Use of lyodura for bone augmentation of osseous defects around dental implants / M. Peleg, G. Chaushu, D. Blinder, S. Taicher // *J Periodontol.* – 1999. – № 70 (8). – P. 853–860.

210. Pellegrini, G. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies / G. Pellegrini, Y.J. Seol, R. Gruber [et al.] // *J Dent Res.* – 2009. – № 88 (12). – P. 1065–1076.

211. Petrunaro, P.S. Immediate implant placement and provisionalization in edentulous, extraction and sinus grafted sites / P.S. Petrunaro // *Compend Contin Educ Dent.* – 2003. – № 24 (2). – P. 95–100.

212. Pettinicchio, M. Histologic and histomorphometric results of three bone graft substitutes after sinus augmentation in humans / M. Pettinicchio, T. Traini, G. Murmura [et al.] // *Clin Oral Investig.* – 2012. – № 16 (1). – P. 45–53.

213. Piattelli, M. Histological evaluation of freeze-dried dura mater (FDDMA) used in guided bone regeneration (GBR): a time course study in man / M. Piattelli, A. Scarano, A. Piattelli // *Biomaterials.* – 1996. – № 17 (24). – P. 2319–2323.

214. Pieri, F. Alveolar ridge augmentation with titanium mesh and a combination of autogenous bone and anorganic bovine bone: a 2-year prospective study / F. Pieri, G. Corinaldesi, M. Fini [et al.] // *J Periodontol.* – 2008. – № 79 (11). – P. 2093–2103.

215. Probst, A. Cellular mechanisms of bone repair / A. Probst, H.U. Spiegel // *J Invest Surg.* – 1997. – № 10 (3). – P. 77–86.

216. Prockop, D.J. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues / D.J. Prockop, C.A. Gregory, J.L. Spees // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – № 100 (Suppl 1). – P. 11917–11923.

217. Prolo, D.J. Biology of bone fusion / D.J. Prolo // *Clin Neurosurg.* – 1990. – № 36. – P. 135–146.

218. Proussaefs, P. The use of resorbable collagen membrane in conjunction with autogenous bone graft and inorganic bovine mineral for buccal/labial alveolar ridge augmentation: a pilot study / P. Proussaefs, J. Lozada // *J Prosthet Dent.* – 2003. – № 90 (6). – P. 530–538.

219. Qu, L. Novel silver nanostructures from silver mirror reaction on reactive substrates / L. Qu, L. Dai // *J Phys Chem B*. – 2005. – № 109 (29). – P. 13985–13990.

220. Raghoobar, G.M. Resorbable screws for fixation of autologous bone grafts / G. M. Raghoobar, R.S. Liem, R.R. Bos [et al.] // *Clin Oral Implants Res*. – 2006. – № 17 (3). – P. 288–293.

221. Rah, D.K. Art of replacing craniofacial bone defects / D.K. Rah // *Yonsei Med J*. – 2000. – № 41 (6). – P. 756–765.

222. Rakhmatia, Y.D. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications / Y.D. Rakhmatia, Y. Ayukawa, A. Furuhashi, K. Koyano // *J Prosthodont Res*. – 2013. – № 57 (1). – P. 3–14.

223. Ratner, B.D. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. An Introduction to Materials in Medicine. 2nd Edition [Text] / B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. // San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. – 851 p.

224. Robiony, M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results / M. Robiony, F. Polini, F. Costa, M. Politi // *J Oral Maxillofac Surg*. – 2002. – № 60 (6). – P. 630–635.

225. Rocuzzo, M. Autogenous bone graft alone or associated with titanium mesh for vertical alveolar ridge augmentation: a controlled clinical trial / M. Rocuzzo, G. Ramieri, M. Bunino, S. Berrone // *Clin Oral Implants Res*. – 2007. – № 18 (3). – P. 286–294.

226. Rocuzzo, M. Vertical alveolar ridge augmentation by means of a titanium mesh and autogenous bone grafts / M. Rocuzzo, G. Ramieri, M.C. Spada [et al.] // *Clin Oral Implants Res*. – 2004. – № 15 (1). – P. 73–81.

227. Romanos, G.E. Immediate versus delayed loading of implants in the posterior mandible: A 2-year prospective clinical study of 12 consecutive cases / G.E. Romanos, G.H. Nentwig // *Int J Periodontics Restorative Dent*. – 2006. – № 26 (5). – P. 459–469.

228. Romanos, G.E. Present status of immediate loading of oral implants / G.E. Romanos // *J Oral Implantol*. – 2004. – № 30 (3). – P. 189–197.

229. Rosenquist, J.B. Alveolar atrophy and decreased skeletal mass of the radius / J.B. Rosenquist, D.J. Baylink, J.S. Berger // *Int J Oral Surg.* – 1978. – № 7 (5). – P. 479–481.
230. Salama, H. The interproximal height of bone: a guidepost to predictable aesthetic strategies and soft tissue contours in anterior tooth replacement / H. Salma, M.A. Salama, D. Garber [et al.] // *Pract Periodontics Aesthet Dent.* – 1998. – № 10 (9). – P. 1131–1141.
231. Sánchez, A.R. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review / A.R. Sánchez, P.J. Sheridan, L.I. Kupp // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 2002. – № 18 (1). – P. 93–103.
232. Sàndor, G.K. Preservation of ridge dimensions following grafting with coral granules of 48 post-traumatic and post-extraction dento-alveolar defect / G.K. Sàndor, V.T. Kainulainen, J.O. Queiroz [et al.] // *Dent Traumatol.* – 2003. – № 19 (4). – P. 221–227.
233. Saulacić, N. Complications in alveolar distraction osteogenesis: A clinical investigation / N. Saulacić, M.M. Somosa, M. de Los Angeles Leon Camacho, A. García García // *J Oral Maxillofac Surg.* – 2007. – № 65 (2). – P. 267–274.
234. Schilephake, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction / H. Schilephake // *Int J Oral Maxillofac Surg.* – 2002. – № 31 (5). – P. 469–484.
235. Schliephake, H. Mandibular onlay grafting using prefabricated bone grafts with primary implant placement: an experimental study in minipigs / H. Schliephake, J. Aleyt // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 1998. – № 13 (3). – P. 384–393.
236. Seibert, J.S. Alveolar ridge preservation and reconstruction / J.S. Seibert, H. Salama // *Periodontol 2000.* – 1996. – № 11 (1). – P. 69–84
237. Sena, P. Application of poly-L-lactide screws in flat foot surgery: histological and radiological aspects of bio-absorption of degradable devices / P. Sena, G. Manfredini, C. Barbieri [et al.] // *Histol Histopathol.* – 2012. – № 27 (4). – P. 485–496.
238. Shi, X. Novel mesoporous silica-based antibiotic releasing scaffold for bone repair / X. Shi, Y. Wang, L. Ren [et al.] // *Acta Biomater.* – 2009. – № 5 (5). – P. 1697–1707.

239. Shimoyama, T. Ridge widening and immediate implant placement: a case report / T. Shimoyama, T. Kaneko, S. Shimizu [et al.] // *Implant Dent.* – 2001. – № 10 (2). – P. 108–112.
240. Shue, L. Biomaterials for periodontal regeneration: a review of ceramics and polymers / L. Shue, Z. Yufeng, U. Mony // *Biomatter.* – 2012. – № 2 (4). – P. 271–277.
241. Silvert, P.Y. Preparation of colloidal silver dispersions by the polyol process. Part 1—Synthesis and characterization / P.Y. Silvert, R. Herrera–Urbina, N. Duvauchelle [et al.] // *J Mater Chem.* – 1996. – № 6 (4). – P. 573–577.
242. Simion, M. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans / M. Simion, A. Scarano, L. Gionso, A. Piattelli // *Int Oral Maxillofac Implants.* – 1996. – № 11 (6). – P. 735–742.
243. Simion, M. Treatment of dehiscences and fenestrations around dental implants using resorbable and nonresorbable membranes associated with bone autografts: a comparative clinical study / M. Simion, U. Misitano, L. Gionso, A. Salvato // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 1997. – № 12 (2). – P. 159–167.
244. Simion, M. Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans / M. Simion, S.A. Jovanovic, P. Trisi [et al.] // *Int J Periodontics Restorative Dent.* – 1998. – № 18 (1). – P. 8–23.
245. Simon, T. Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1–5 year follow-up / T. Simon, S.A. Jovanovic, C. Tinti, S.P. Benfenati // *Clin Oral Implants Res.* – 2001. – № 12 (1). – P. 35–45.
246. Sondi, I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria / I. Soni, B. Salopek-Sondi // *J Colloid Interface Sci.* – 2004. – № 275 (1). – P. 177–182.
247. Speroni, S. Hard and soft tissue augmentation in implant surgery: a case report / S. Speroni, F. Briguglio, P. Maridati [et al.] // *Minerva Stomatol.* – 2011. – № 60 (3). – P. 123–131.

248. Stiller, M. 1-stage vs 2-stage sinus augmentation: A retrospective study of two different methods using implants with a special progressive thread design / M. Stiller, E. Kapogianni, M. Roggensack [et al.] // Scientific Poster, 19th Annual Meeting of the Academy of Osseointegration, March 2004. – P. 18–20.

249. Strietzel, F.P. Risiken und Komplikationen der membrangesteuerten Knochenregeneration / F.P. Strietzel // Mund Kiefer Gesichtschirurgie. – 2001. – № 5 (1). – P. 28–32.

250. Studer, S. Adjustment of localized alveolar ridge defects by soft tissue transplantation to improve mucogingival esthetics: a proposal for clinical classification and an evaluation of progress / S. Studer, R. Nalf, P. Schärer // Quintessence Int. – 1997. – № 28 (12). – P. 785–805.

251. Sumi, Y. Alveolar ridge augmentation with titanium mesh and autogenous bone / Y. Sumi, O. Miyaishi, I. Tohnai, M. Ueda // Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. – 2000. – № 89 (3). – P. 268–270.

252. Sun, Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles / Y. Sun, Y. Xia // Science. – 2002. – № 298 (5601). – P. 2176–2179.

253. Thompson, E.M. Recapitulating endochondral ossification: a promising route to in vivo bone regeneration / E.M. Thompson, A. Matsiko, E. Farrell [et al.] // J Tissue Eng Regen Med. – 2015. – № 9 (8). – P. 889–902.

254. Tinti, C. Spacemaking metal structures for nonresorbable membranes in guided bone regeneration around implants. Two case report / C. Tinti, S. Parma-Benfenati, F. Manfrini // Int J Periodontics Restorative Dent. – 1997. – № 17 (1). – P. 53–61.

255. Torroni, A. Engineered bone grafts and bone flaps for maxillofacial defects: the state of the art / A. Torroni // J Oral Maxillofac Surg. – 2009. – № 67 (5). – P. 1121–1127.

256. Trimpou, G. The efficient fabrication of implant-supported conical crown-retained prostheses on pre-fabricated female and male parts of the ANKYLOS® system / G. Trimpou, P. Weigl, R. Arnold [et al.] // Interdisziplin J Proth Zahnheilk. – 2003. – № 6 (2). – P. 126–137.

257. Trombelli, L. GBR and autogenous cortical bone particulate by bone scraper for alveolar ridge augmentation: a 2-case report / L. Trombelli, R. Farina, A. Marzola [et al.] // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 2008. – № 23 (1). – P. 111–116.

258. Uckan, S. Alveolar distraction: analysis of 10 cases / S. Uckan, S.G. Haydar, D. Dolanmaz // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* – 2002. – № 94 (5). – P. 561–565.

259. Urban, I.A. Vertical ridge augmentation using bone regeneration (GBR) in three clinical scenarios prior to implant placement: A retrospective study of 35 patients 12 to 72 month after loading / I.A. Urban, S.A. Javanovic, J.L. Lozada // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 2009. – № 24 (3). – P. 502–510.

260. Urist, M.J. Surgery in horizontal strabismus / M.J. Urist // *Am J Ophthalmol.* – 1963. – № 55 – P. 62–80.

261. Van Alst, M. ABC's of bioabsorption: application of lactide based polymers in fully resorbable cardiovascular stents / M. van Alst, M.J. Eenink, M.A. Krufft [et al.] // *EuroIntervention.* – 2009. – № 5 (Suppl F). – P. F23–F27.

262. Vasilic, N. The use of bovine porous bone mineral in combination with collagen membrane or autologous fibrinogen/fibronectin system for ridge preservation following tooth extraction / N. Vasilic, R. Henderson, T. Jorgenson [et al.] // *J Okla Dent Ass.* – 2003. – № 93 (4). – P. 33–38.

263. Von Arx, T. Implant placement and simultaneous peri-implant bone grafting using a micro titanium mesh for graft stabilization / T. von Arx, B. Kurt // *Int J Periodontics Restorative Dent.* – 1998. – № 18 (2). – P. 117–127.

264. Von Arx, T. Implant placement and simultaneous ridge augmentation using autogenous bone and a micro titanium mesh: a prospective clinical study with 20 implants / T. von Arx, B. Kurt // *Clin Oral Implants Res.* – 1999. – № 10 (1). – P. 24–33.

265. Von Arx, T. Localized ridge augmentation using a micro titanium mesh: a report on 27 im-plants followed from 1 to 3 years after functional loading / T. von Arx, B. Wallkamm, N. Hardt // *Clin Oral Implants Res.* – 1998. – № 9 (2). – P. 123–130.

266. Wälivaara, D.A. Description of a technique for evaluation of three-dimensional shape alterations in soft tissue after intra oral bone reconstruction / D.A.

Wälivaara, S. Isaksson, S. Rosén // *Br J Oral Maxillofac Surg.* – 2007. – № 45 (5). – P. 382–386.

267. Walton, M. Long-term in vivo degradation of poly-L-lactide (PLLA) in bone / M. Walton, N.J. Cotton // *J Biomater Appl.* – 2007. – № 21 (4). – P. 395–411.

268. Wan, C. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration / C. Wan, S.R. Gilbert, Y. Wang [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – № 105 (2). – P. 686–691.

269. Waters, C.A. Purification of dodecanethiol derivatised gold nanoparticles / C.A. Waters, A.J. Mills, K.A. Johnson, D.J. Schiffrin // *Chem Commun (Camb).* – 2003. – № 4. – P. 540–541.

270. Weir, N.A. Degradation of poly-L-lactide. Part 2: increased temperature accelerated degradation / N.A. Weir, F.J. Buchanan, J.F. Orr [et al.] // *Proc Inst Mech Eng H.* – 2004. – № 218 (5). – P. 321–330.

271. Wildemann, B. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations / B. Wildemann, A. Kadow-Romacker, N.P. Haas, G. Schmidmaier // *J Biomed Mat Res A.* – 2007. – № 81 (2). – P. 437–442.

272. Xu, J. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles stabilized by gemini surfactant / J. Xu, X. Han, H. Liu, Y. Hu // *Colloids Surf. A.* – 2006. – № 273 (1–3). – P. 179–183.

273. Yamanaka, M. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis / M. Yamanaka, K. Hara, J. Kudo // *Appl Environ Microbiol.* – 2005. – № 71 (11). – P. 7589–7593.

274. Yang, Y. Cyclodextrin as a capturing agent for redundant surfactants on Ag nanoparticle surface in phase transfer process / Y. Yang, S. Liu, K. Kimura // *Colloids Surf A.* – 2006. – № 290 (1–3). – P. 143–149.

275. Yin, Y. Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process / Y. Yin, Z.Y. Li, Z. Zhong [et al.] // *J Mater Chem.* – 2002. – № 12 (3). – P. 522–527.

276. Yukna, R.A. Evaluation of hard tissue replacement composite graft material as a ridge preservation/augmentation material in conjunction with immediate hydroxyapatite-coated dental implants / R.A. Yukna, P. Castellon, A.M. Seanz-Nasr [et al.] // *J Periodontol.* – 2003. – № 74 (5). – P. 679–686.

277. Zana, R. Dimeric and oligomeric surfactants. Behavior at interfaces and in aqueous solution: a review / R. Zana // *Adv Colloid Interface Sci.* – 2002. – № 97 (1–3). – P. 205–253.

278. Zhang, C.L. Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects / C.L. Zhang, S.H. Yu // *Chem Soc Rev.* – 2014. – № 43 (13). – P. 4423–4448.

279. Zitzmann, N.U. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration / N.U. Zitzmann, R. Naef, P. Schärer // *Int J Oral Maxillofac Implants.* – 1997. – № 12 (6). – P. 844–852.