

На правах рукописи



Гостев Михаил Сергеевич

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

3.1.7. Стоматология

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

кандидат медицинских наук, доцент

Дьячкова Екатерина Юрьевна

доктор химических наук, доцент

Тимашев Петр Сергеевич

Официальные оппоненты:

Атрушкевич Виктория Геннадьевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра терапевтической стоматологии и пародонтологии, заведующий кафедрой

Деев Роман Вадимович – кандидат медицинских наук, доцент, «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», первый заместитель директора

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «19» сентября 2024 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.27 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37, стр. 1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент



Дикопова Наталья Жоржевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В современной стоматологии, в частности в мукогингивальной хирургии, возрастает актуальность проблемы закрытия послеоперационных раневых дефектов слизистой оболочки рта. Распространённость заболеваний, сопряженных с этой проблемой, по современным данным достигает 60%. К этой категории относятся пациенты с рецессий десны, мелким преддверием полости рта, недостаточной зоной кератинизированной прикрепленной слизистой оболочки и т. д. (Атрушкевич В. Г., 2022; Шалак О. В., Деев Р. В., 2022; Яременко Я. И., Атрушкевич В. Г., 2021., Carrilho M. R. O., 2017; Chrysanthakopoulos N. A., Saini R., 2016; Merijohn G. K., 2016; Cortellini P., Bissada N. F., 2018; Handelman C. S., Eltink A. P., BeGole E., 2018).

Причем риск развития послеоперационных осложнений варьирует от 20 до 80 % (Трунин Д. А., 2021). Так, после вестибулопластики по Кларку, наиболее распространенной операцией для увеличения глубины преддверия полости рта и зоны прикрепленной кератинизированной десны, раневая поверхность надкостницы заживает вторичным натяжением с возможным образованием деформирующих рубцов в послеоперационной области (Silvestre Ripoll, Angela Fernández de Velasco-Tarilonte, Beatriz Bullón, et al 2021). В связи с этим для закрытия послеоперационных дефектов слизистой оболочки рта в области преддверия полости рта предложено использовать различные материалы биологического происхождения (аутогенного, аллогенного, ксеногенного) в расчёте на их биоинтеграцию.

Преимущества аутогенных материалов убедительно доказаны многими клиническими и лабораторными исследованиями (Зукелли Д., 2014; Jeong-Kui Ku, Dae Ho Leem, 2019, Цур О., Хюрцелер М., 2014). Однако использование аутогенных трансплантатов требует проведения дополнительной операции в донорской области вследствие того, что пересаженный лоскут может атрофироваться и даже некротизироваться. Кроме того, в связи с недостаточным объемом свободных

тканей слизистой оболочки твердого неба закрытие больших дефектов слизистой оболочки не представляется возможным. После забора аутотрансплантата на небе остается открытая раневая поверхность, которая заживает вторичным натяжением. Послеоперационное течение сопряжено со значительным дискомфортом для пациентов, что ограничивает применение данного метода в хирургической практике (Тарасенко С. В., Загорский С. В., Дьячкова Е. Ю., 2019; С. Bherwani, A. Kulloli, R. Kathariya, 2014).

Альтернативным методом создания объема прикрепленной кератинизированной десны является применение материалов на основе коллагена. Сегодня разработано и применяется в практической стоматологии большое количество коллагенсодержащих матриц, мембран. Повышенный интерес к ним обусловлен их свойствами: биосовместимостью, биодegradацией, прочностью, эластичностью, способностью формировать различные структуры (Файзуллин А. Л., Шехтер А. Б., Истранов Л. П. с соавт., 2020). Например, для увеличения зоны прикрепленной кератинизированной десны. широкое применение получил коллагеновый матрикс Mucograft компании «Geistlich Pharma AG» (Швейцария)

Социальная значимость разработок биосовместимых материалов отечественного производства в рамках программы Президента РФ по импортозамещению обусловлена потребностями медицины в материалах, обладающих регулируемой биологической активностью и обеспечивающих активацию репаративных процессов. Так, в Институте регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России Сеченовский Университет) разработана новая коллагеновая мембрана, полученная из бычьего ахиллова сухожилия. Персонализация мембраны достигается за счет регулирования структуры материала, в частности пористости и контроля инвазии в него окружающих тканей, степени сшивки коллагеновых волокон и регулирования сроков биодegradации в организме.

Степень разработанности темы исследования

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

Один из основных вопросов касается способности биоматериалов выделять антимикробные препараты в месте имплантации. Комбинации биоматериалов с лактоферрином или другими типами антимикробных пептидов могут стать перспективным компонентом решения проблемы защиты костнопластических материалов от инфицирования бактериями со множественной лекарственной устойчивостью.

Предложен широкий спектр соединений и технологических подходов, но для получения ожидаемого эффекта важно установить их биосовместимость, антимикробную эффективность и длительность действия в зоне интереса.

Таким образом, представляет интерес разработка и изучение эффективности резорбируемых мембран, в том числе с активными веществами, предотвращающими инфицирование раны, для закрытия раневых дефектов слизистой оболочки рта у пациентов при проведении операций в полости рта.

Выполнение работ по диссертационному исследованию было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации заявка на грант № 23-075-67362-1-0-0409-000377 (Сеченовский Университет).

Цели и задачи исследования

Цель:

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

Задачи:

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

Научная новизна

1. Впервые был применен аппаратный способ для изучения механических свойств новых «персонализированных коллагеновых мембран»: прочность, растяжимость, абсорбция.
2. Впервые исследовали эффективность «персонализированных коллагеновых мембран» для закрытия дефектов слизистой оболочки полости рта в эксперименте на кроликах.
3. Впервые провели оценку *in vivo* состояния слизистой оболочки полости рта с применением «персонализированных коллагеновых мембран» у лабораторных животных.
4. Впервые в эксперименте провели сравнительный гистологический анализ регенератов слизистой оболочки полости рта кроликов после пластики с применением «персонализированных коллагеновых мембран», коллагенового матрикса Mucograft «Geistlich Pharma AG» (Швейцария) и раневой поверхности, заживающей вторичным натяжением; показано большее количество вновь

образованных кровеносных сосудов. Высокая степень регенерации также доказана увеличением количества α -SMA-позитивных клеток, преимущественно фибробластического ряда и гладких миоцитов, а также при увеличении пучков коллагеновых волокон при гистохимической реакции по Маллори.

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

Методология и методы исследования

Работа построена в классическом дизайне и представляет собой экспериментальное исследование, состоящее из нескольких частей: лабораторного

in vitro и на экспериментальных животных in vivo. Теоретический анализ современного состояния проблемы проведен путем поиска необходимой информации в открытых ресурсах E-Library, Scopus, Web of Science, Google Scholar.

В диссертационном исследовании применены общепринятые лабораторные экспериментальные методы:

1. Анализ механических свойств «персонализированной коллагеновой мембраны» и мембраны с лактоферрином: прочность, растяжимость, абсорбция. Механические свойства образцов сшитых и несшитых коллагеновых пленок протестированы во влажном состоянии с использованием микромеханической испытательной системы Mach-1 v 500 (Biomomentum Inc., Лаваль, Квебек, Канада). Тестирование образцов во влажном режиме проведено после их инкубации PBS в течение ночи 4 °С. Прочность на разрыв, удлинение при разрыве и модуль упругости (модуль Юнга) измерены во время одноосного растяжения по меньшей мере пяти образцов размерами 30*5 мм и представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

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

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

Положения, выносимые на защиту

1. Оптимальным вариантом мембраны по результатам изучения физических свойств являются мембраны типа «интерфейс», которые на одной из

своих сторон имеют пористую структуру, на обратной — непористую, так как обладают высокой прочностью на разрыв и низкой цитотоксичностью.

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

3. Результаты морфологического исследования свидетельствуют о регенерации мягких тканей с вестибулярной стороны верхней челюсти и на твердом небе в полном объеме в случае использования мембран из персонализированного коллагена и персонализированного коллагена с лактоферрином. При этом плотность вновь образованных кровеносных сосудов на единицу площади была значительно выше при использовании разработанных мембран, чем в случае применения матрикса Mucograft (560, 490 и 410 на кв. мм, соответственно, $p < 0,05$), что свидетельствует о качестве регенерата и прогнозирует сохранение объема тканей в отдаленном послеоперационном периоде.

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

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертация построена по доказательному сценарию, что обеспечено необходимым объемом экспериментального материала, а также адекватным современным дизайном исследования. Все данные, использованные для формирования основных научных положений работы, получены с использованием сертифицированного оборудования и материалов, включающих в себя комплекс

физических, микроскопических, ультрамикроскопических исследований. В работе применены современные методики математической обработки количественных результатов, статистические критерии использованы после предварительной проверки на нормальность распределения, для попарного и множественного сравнения использованы соответствующие статистические критерии.

Основные положения работы доложены и обсуждены на Юбилейной конференции по медицинской микологии и микробиологии (г. Москва, 17–18 мая 2023 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы современной стоматологии» (г. Воронеж, 22 ноября 2023 г.), XII Национальном конгрессе с международным участием имени Н. О. Миланова «Пластическая хирургия, эстетическая медицина и косметология» (г. Москва, 13 декабря 2023 г.), XXXIII Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные науки сегодня» (Индия, Bengaluru, Karnataka, 22–23 января 2024 г.).

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

Личный вклад автора

Автором проведен детальный анализ отечественной и зарубежной литературы, на основании которого определено научное направление данной работы и написан обзор литературы, сформулированы цель и задачи исследования, разработан дизайн исследования и выбраны методы. Автором было лично осуществлено оперативное вмешательство на лабораторных животных, проведены

контрольные осмотры и необходимые физические замеры, прямое участие в подготовке препаратов для дальнейшего гистологического исследования. Автор самостоятельно обработал результаты исследования и вместе с соавторами подготовил публикации по всем разделам диссертации. Автор выступал на конференциях регионального, всероссийского и международного уровней с результатами исследований.

Публикации по теме диссертации

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Структура и объем диссертации

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В институте регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) разработана новая коллагеновая мембрана, полученная из бычьего ахиллова сухожилия. За счет комбинирования методов сшивки, механической перфорации и лиофилизации получали три различные персонализированные формы коллагеновой матрицы: мембрана, губка, интерфейс.

Для проведения дальнейшей экспериментальной работы по направлению была выбрана персонализированная форма коллагеновой матрицы — «Интерфейс», именуемая в тексте аннотации и аспирантской работы как «мембрана».

Механические свойства персонализированного коллагена тестировали во влажных условиях с использованием системы микромеханических испытаний Mach-1 v500csst (Biomomentum Inc., Лаваль, Квебек, Канада). Одноосное растяжение выполняли со скоростью 0,1 мм/с до разрушения. Параметры рассчитывали по кривым деформации в соответствии с протоколом производителя.

Для *измерения набухания* высушенные образцы коллагеновых мембран сначала взвешивали, затем помещали в PBS при 4 °C на ночь. Затем образцы зажимали между двумя листами фильтровальной бумаги для удаления лишней влаги и снова взвешивали. Степень набухания выражали как изменение в процентах.

Измерения температуры усадки проводили гидротермическим методом с использованием лабораторного прибора. Для этого полоски мембран погружали в водяную баню с дистиллированной водой. Температуру водяной бани повышали примерно на 5°C/мин. Таким же образом проводили *измерение температуры сваривания*.

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

пуповины. Способность клеток восстанавливать резазурин до резорурфина под действием митохондриальных ферментов измерялась как индикатор их жизнеспособности. Измерения флуоресценции проводили на спектрофлуориметре VictorNivo (Perkinelmer, США) при длине волны возбуждения 580/20 нм и эмиссии 625/30 нм.

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

Для проведения теста прямой цитотоксичности использовалось два типа клеток: НИН 3Т3 и МСК из пуповины. Для визуализации жизнеспособности клеток на коллагеновых пленках проводили окраску живых и мертвых клеток (Live/Dead assay). Живые клетки окрашивали кальцеином 0,5 мг/мл (Calcein-AM, Sigma-Aldrich, Германия), мертвые — йодидом пропидия 1,5 мкМ (ThermoFisher Scientific, США), также были докрашены ядра (0,004 мг/мл Hoechst 33258, Thermo Scientific, США). Затем образцы отмывали средой DMEM/F12 (1:1, БиолоТ, Россия) 3 раза и анализировали с применением лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 880 (Zeiss, Германия).

В экспериментальное исследование *in vivo* было включено 12 лабораторных животных — половозрелых самцов кроликов породы «Советская шиншилла» весом 3–3,5 кг. Кролики были разделены на 4 группы в зависимости от используемой мембраны для закрытия раневой поверхности: 1-я группа — персонализированный коллаген без лактоферрина, 2-я группа — персонализированный коллаген с лактоферрином, 3-я группа — коллагеновый матрикс Mucograft, 4-я группа (контрольная) — заживление вторичным натяжением. Каждая группа состояла из 6 кроликов, у которых были выявлены 2 рабочие стороны: контрольная, где заживление проходило путем вторичного натяжения, и основная, где заживление

проходило в условиях имплантации мембран из персонализированного коллагена в области раневого дефекта и плотного подшивания ран (Рисунок 1).

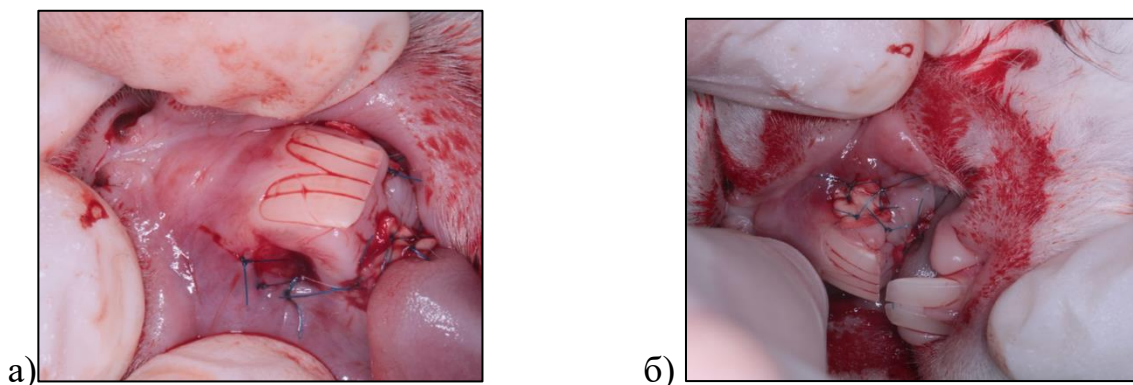


Рисунок 1 – Группа 1: а) справа — заживление раны вторичным натяжением; б) слева — рана закрыта персонализированным коллагеном

Степень выраженности отека и гиперемии оценивали в условных баллах от первоначальной ситуации. *Оценку регенерации* проводили в процентах от общей площади дефекта с помощью измерения градуированным пародонтальным зондом, линейки и штангенциркуля. *Послеоперационный контроль* осуществляли на 3, 5, 7 и 14 сутки.

Морфологическое исследование. После выведения животных из эксперимента проводили вырезку мягких тканей с углублением до кости верхней челюсти размерами 1,5*1,5 см с отступом от контрольных точек. Полученные фрагменты помещали в 10 % раствор формалина. Срезы толщиной 3–4 микрометра окрашивали гематоксилином и эозином, а также трихромом по Маллори. Кроме того, проводили иммуногистохимическое исследование с антителами к α -SMA. Образцы были изучены на базе Научно-технологического парка биомедицины методом стандартной оптической микроскопии с помощью универсального микроскопа LEICA DM4000 B, оснащенного видеокамерой LEICA DFC7000 T и программным обеспечением LAS V4.8 (Leica Microsystems, Германия).

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

Микробиологическое исследование было выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И.Мечникова» совместно с член-корр. РАН д.м.н. профессором Свитич Оксана Анатольевна. *Сравнительный анализ микробного роста* на поверхности полученных коллагеновых мембран проводили при «заселении» их поверхности штаммами условно-патогенных микроорганизмов полости рта. Для проведения экспериментов были выбраны *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* как наиболее клинически значимые. В исследовании изучали мембраны трех видов: 2 полученные на базе Сеченовского Университета (коллагеновую мембрану и коллагеновую мембрану с лактоферрином) и 1 в качестве контроля — коллагеновый матрикс Mucograft.

Контроль образования биопленок осуществляли визуально и готовили препараты-мазки с окраской по Грамму. Образцы разделили на 4 группы по 3 образца в каждой: 1-я (контрольная) — в которой анализировали характер роста бактерий без их помещения на поверхность коллагеновой мембраны; 2-я — микробный рост на поверхности персонализированной коллагеновой мембраны; 3-я — рост бактерий на поверхности коллагеновой мембраны с лактоферрином; 4-я (сравнения) — микробный рост на поверхности коллагенового матрикса «Mucograft». Также проводили оценку изменения pH 10 % раствора сахарозы под влиянием микроорганизмов биопленки во всех группах. Временные точки измерения составляли 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 мин.

Результаты собственных исследований и обсуждение

После персонализации все три формы персонализированного коллагена сравнивали между собой (мембрана, губка, интерфейс). Результаты измерения толщины, набухаемости и температуры сваривания персонализированного коллагена представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Параметры персонализированного коллагена (мембрана, губка, интерфейс)

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

$P > 0,05$

Ожидается, что мембранная форма матрицы обладала самой высокой степенью упругости ($5,8 \pm 1,3$ МПа), в то время как губка и интерфейс обладали в два раза меньшей упругостью: $2,2 \pm 0,5$ МПа и $2,6 \pm 0,5$ МПа (Рисунок 2). Растяжение на разрыв обладала той же тенденцией: самое высокое у мембраны — $80,8 \pm 11$ %, у губки и интерфейса $46,2 \pm 12$ % и 51 ± 12 %, соответственно.

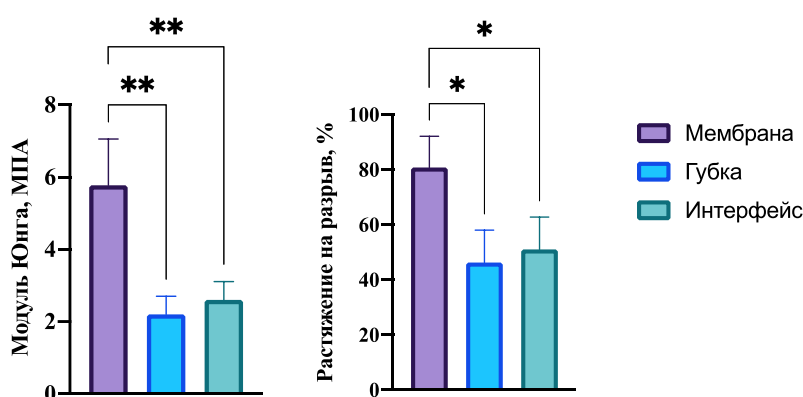


Рисунок 2 – Механические свойства персонализированных форм коллагеновой матрицы: упрочненная мембрана (мембрана); губчатая мембрана (губка); сочетание мембраны и губки (интерфейс)

Результаты изучения биологических свойств полученных мембран in vitro. Сшивка химическим агентом не повлияла на токсические свойства персонализированного коллагена (Рисунок 3 а). Метаболическая активность клеток для нулевой концентрации и трехкратной концентрации была одинаковой для персонализированного коллагена.

Окраска Live/Dead позволила визуализировать жизнеспособность клеток: живые окрашиваются в зеленый цвет, мертвые — в красный (Рисунок 3 б).

Электроосажденные коллагеновые матрицы позволяют клеткам прикрепляться и хорошо расти и не являются токсичными.

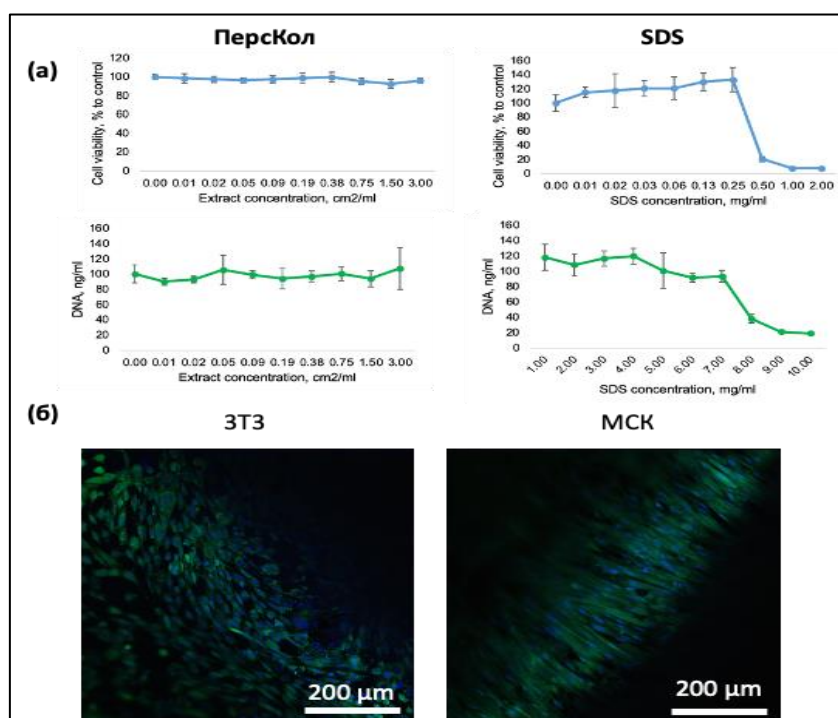


Рисунок 3 – Показатели цитотоксичности созданных персонализированных коллагеновых матриц (на примере формы «мембрана»)

- а) Экстракционный тест коллагеновых мембран в сравнении с контролем SDS
 б) Live/Dead тест коллагеновых мембран с двумя типами клеток, 3Т3 и МСК

Результаты экспериментального исследования на лабораторных животных. Уже на 3-е сутки в полости рта экспериментальных животных в области проведения вестибулопластики при использовании мембран и без их применения отек был умеренным. Незначительный отек в зоне проведения вестибулопластики и на твердом небе сохранялся на 5-е сутки в группе применения мембран с лактоферрином и без него. Гиперемия в группе с применением мембран с лактоферрином не определялась или была незначительной, тогда как в группе использования мембран без него сохранялась умеренная и даже выраженная гиперемия. ($p > 0,05$). На 7-е сутки у большинства животных (83 %) отек и гиперемия не определялись, незначительная гиперемия сохранялась в области применения мембран без лактоферрина. В зоне твердого неба отмечали начало процесса эпителизации (Таблица 2).

На 14-е сутки наблюдали практически 100 % заживление в области твердого неба в группе применения ПерсКоллагена и ПерсКоллагена с лактоферрином. В области применения мембраны без лактоферрина полнота эпителизации колебалась от 70 до 90 % площади раны ($p < 0,001$), (Таблица 3).

Таблица 2 – Степень эпителизации интраоперационного дефекта (в % от начальной площади) в области преддверия лабораторных животных (7,14 сутки)

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

Таблица 3 – Полнота эпителизации операционного дефекта (в % от площади раны) у лабораторных животных на твердом небе в послеоперационном периоде (7 и 14 сутки)

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

Продолжение Таблицы 3

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

По результатам *морфологического исследования* (Рисунок 4) формирование новых зрелых мягких тканей в более полном объеме с вестибулярной стороны и на твердом небе происходило в случае использования мембран из персонализированного коллагена и персонализированного коллагена с лактоферрином; плотность вновь образованных кровеносных сосудов на единицу площади была значительно выше при использовании разработанных мембран, чем в случае применения мембраны Mucograft (490, 560 и 410, на 1 мм² соответственно, $p < 0,001$).

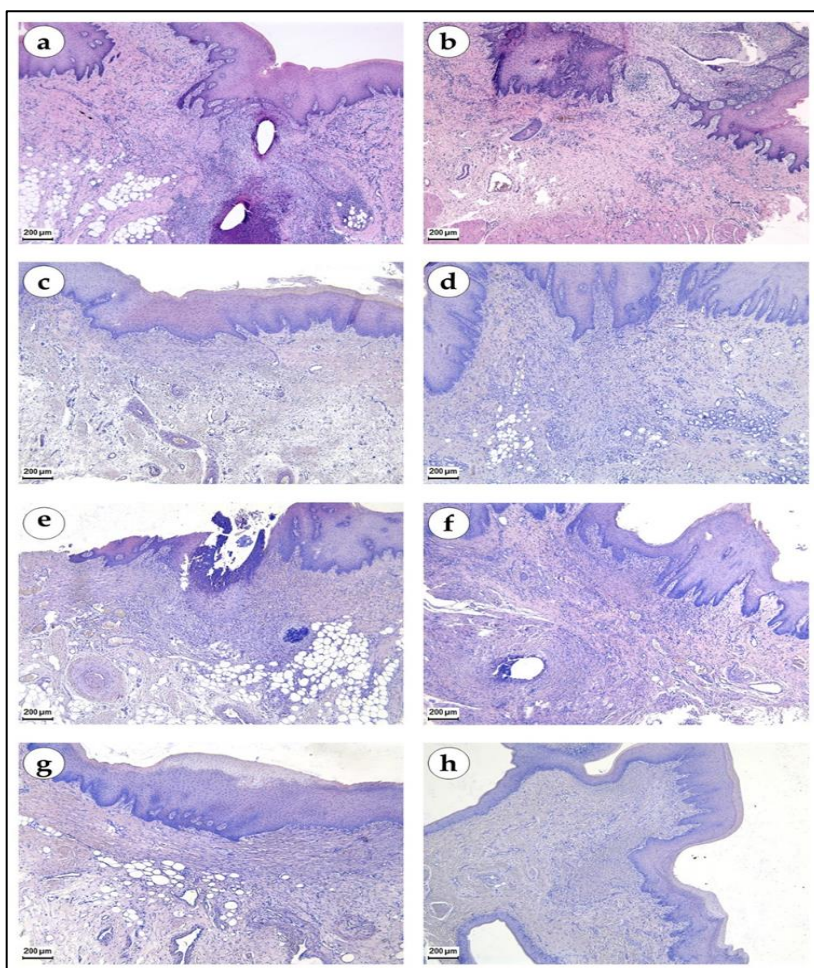


Рисунок 4 – Микроструктура без имплантированного материала и после имплантации в область интраоперационного дефекта слизистой твердого неба и области преддверия полости рта лабораторных животных матрикса Mucograft, разработанной коллагеновой мембраны и разработанной коллагеновой мембраны с лактоферрином: заживление вторичным натяжением — твердое небо (a) и преддверие полости рта (b); при использовании матрикса Mucograft — твердое небо (c) и преддверие полости рта (d); при применении разработанной коллагеновой мембраны — твердое небо (e) и преддверие полости рта (f); при применении разработанной коллагеновой мембраны с лактоферрином — твердое небо (g) и преддверие полости рта (h). Окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 50$:

Результаты микробиологического исследования. Наименьшее количество КОЕ было обнаружено при разрушении мембраны 3 ($8,0 \times 10^6$), несколько больше высевали с мембраны Mucograft — $1,2 \times 10^7$, с мембраны 2 высева был в 3 раза больше — $2,5 \times 10^7$. Результаты посева жизнеспособных клеток на 5 сутки формирования указывают на резкое увеличение КОЕ у мембран: № 3 — в 4,3 раза, а у Mucograft — в 10 раз. Высев после 7 суток формирования биопленок свидетельствует о снижении КОЕ у всех исследованных видов мембран.

При изучении изменения рН 10 % раствора сахарозы было отмечено, что на 3 сутки исследования для бактерии *S.mutans* к 30 минуте наибольшее смещение к щелочной среде происходило для коллагеновой мембраны с лактоферрином ($p>0,05$). На 5 сутки исследования в области всех мембран смещение снижалось и значения приближались к исходному — 5,5.

На 3 сутки для *S.aureus* отмечали умеренное увеличение рН среды для мембраны с лактоферрином и для Mucograft, тогда как в случае персонализированной коллагеновой мембраны рН среды практически оставалось неизменным (около 5,5) ($p=0,01$, $p<0,05$).

На 3 сутки для *C.albicans* отмечали умеренное увеличение рН среды для мембраны с лактоферрином и для Mucograft, на 5-е также происходило снижение рН для всех мембран. На 7-е сутки происходило выравнивание значения рН для всех мембран к схожим значениям, но выше изначального 5,5.

Проведенный сравнительный анализ микробного роста на примере условно-патогенных микроорганизмов полости рта, колонизировавших поверхность различных коллагеновых мембран, показал их допустимые значения на всех сроках исследования (до 7 суток), что особенно важно для регенерации мягких тканей в условиях потенциальной микробной контаминации.

ВЫВОДЫ

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

2. По данным клинических методов исследования, более благоприятное течение послеоперационного периода отмечали в случае закрытия обширных раневых дефектов слизистой оболочки рта лабораторных животных биорезорбируемыми мембранами из персонализированного коллагена и коллагенового матрикса Mucograft, чем при заживлении вторичным натяжением. Разница показателей выраженности отека составила в среднем 0,3–0,5 балла,

гиперемии — 0,2–0,5 балла ($p>0,05$), полнота эпителизации операционного дефекта в среднем отличалась на 5–7 % ($p<0,001$).

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

3. По результатам проведенных исследований рекомендовано применять мембраны из персонализированного коллагена для устранения дефектов слизистой

оболочки рта, в том числе при проведении вестибулопластики и закрытия раневых дефектов на твердом небе.

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

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Экспериментальное обоснование применения биорезорбируемых персонализированных коллагеновых мембран для закрытия дефектов слизистой оболочки рта / **М. С. Гостев**, С. В. Тарасенко, С. В. Казумян, Е.Ю. Дьячкова, П.С. Тимашев // **Институт стоматологии**. – 2023. – № 4 (101). – С. 126–127.

2. Свитич О. А., Поддубиков А. В., Тимашев П. С., Дьячкова Е. Ю., **Гостев М. С.**, Вартанова Н. О. Сравнительный анализ роста условно-патогенных микроорганизмов полости рта на поверхности коллагеновых мембран: экспериментальное исследование. // **Пародонтология**. – 2023. – № 4. – С. 337–346.

3. **Гостев М. С.**, Дьячкова Е. Ю., Тарасенко С. В., Тимашев П. С., Солодов Н. Р., Казумян С. В. Сравнительный анализ методов хирургического устранения дефектов слизистой оболочки полости рта в эксперименте. Сборник материалов конференции «Актуальные вопросы хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» (1 декабря 2023 года, г. Москва, Россия). – С. 28.

4. Казумян С. В., **Гостев М. С.**, Дьячкова Е. Ю., Тимашев П. С. Анализ применения резорбируемых коллагеновых мембран с лактоферрином для устранения дефектов слизистой оболочки рта в эксперименте. SIBS-2023 VII Сеченовский международный биомедицинский саммит: мегатренды в биомедицине. (8–9 ноября 2023 г., г. Москва, Россия). – С. 15.

5. Казумян С. В., **Гостев М. С.**, Дьячкова Е. Ю. Экспериментальное обоснование применения биорезорбируемых персонализированных коллагеновых мембран для закрытия дефектов слизистой оболочки рта. XII Национальный конгресс с международным участием имени Н. О. Миланова «Пластическая

хирургия, эстетическая медицина и косметология» (13 декабря 2023 г., г. Москва, Россия). – С. 123.

6. **Гостев, М. С.**, Тарасенко, С. В., Казумян, С. В., Дьячкова, Е. Ю., Усанова, А. П., Файзуллин, А. Л., Тимашев, П. С., Садчикова, Е. Р. Экспериментальное обоснование применения биорезорбируемых персонализированных коллагеновых мембран для закрытия дефектов слизистой оболочки рта. // **Проблемы стоматологии.** – 2023. – № 4 – С. 77–82.

7. Antoshin, A., **Gostev, M.**, Khristidis, Y., Giliazova, A., Voloshin, S., Blagushina, N., Smirnova, O., Diachkova, E., Istranova, E., Usanova, A., et al. Electrophoretically Co-Deposited Collagen-Lactoferrin Membranes with Enhanced Pro-Regenerative Properties for Oral Soft Tissue Regeneration. – **International Journal of Molecular Sciences.** – 2023. – № 24 (24). – P. 17330 [Scopus]

8. **Гостев М. С.**, Тарасенко С. В., Дьячкова Е. Ю., Тимашев П. С., Казумян С. В. Экспериментальное исследование применения резорбируемой персонализированной коллагеновой мембраны для устранения дефектов слизистой оболочки рта. «Фундаментальные и прикладные науки сегодня» Fundamental and applied sciences today XXXIII (22–23 января 2024 г., Bengaluru, Karnataka, Индия). – С. 52–56.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМП – антимикробные пептиды

БАВ – биологически активные вещества

ДКТ – двухэнергетическая компьютерная томография

КЛКТ – конусно-лучевая компьютерная томография

ЛФ – лактоферрин

НКР – направленная костная регенерация

НТР – направленная тканевая регенерация

ПКР – плоскоклеточный рак

ПТФЭ – политетрафторэтилен

рчЛФ – рекомбинантный человеческий лактоферрин

чЛФ – человеческий лактоферрин

GFP – зеленый флуоресцентный белок