

*На правах рукописи*



**Бороздкин Леонид Леонидович**

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

3.1.7. Стоматология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

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)

**Научный руководитель:**

доктор медицинский наук, профессор,  
член-корреспондент РАН

**Иванов Сергей Юрьевич**

**Официальные оппоненты:**

**Лепилин Александр Викторович** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра стоматологии хирургической и челюстно-лицевой хирургии, заведующий кафедрой

**Панин Андрей Михайлович** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра хирургической стоматологии, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского»

Защита диссертации состоится «16» февраля 2023 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.27 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат медицинских наук, доцент



**Дикопова Наталья Жоржевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

К настоящему времени в стоматологической практике накоплен значительный клинический опыт по устранению дефектов зубных рядов с помощью дентальных имплантатов (Диланян М.Х., 2014; Иванов С.Ю. и соавт., 2015). Мостовидные конструкции с опорой на дентальные имплантаты существенно повышают качество жизни пациентов, обеспечивая значительный комфорт и функциональность (Иванов С.Ю. и соавт., 2013; Rocuzzo M. et al., 2007; Thompson E.M. et al., 2015). Вместе с тем, при дефектах зубных рядов большой протяженности и выраженной атрофией костной ткани, связанной с потерей зубов, осуществление дентальной имплантации затруднено (Кулаков А.А. и соавт., 2001; Nochini P.F. et al., 2002; Ratner B.D. et al., 2004).

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 (Мураев А.А. и соавт., 2016). Данные мембраны выполняют защитную функцию для предотвращения резорбции трансплантатов (Khan S.N. et al., 2005; Rocuzzo M. et al., 2006). Основными требованиями к материалам мембран являются: высокая биосовместимость, синхронность резорбирования с формированием новообразованной костной ткани (Гурин А.Н. и соавт., 2009; Лосев В.Ф. и соавт., 2009; Baeke J.L., 2002; Leiggener C.S. et al., 2006). К таким материалам могут быть отнесены биорезорбируемые полимеры на основе полимолочной кислоты (Simion M. et al., 1998), 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 (Саломатина Е.В., 2015). Уникальные антимикробные и антивирусные качества соединений серебра основаны на медленном окислении с

высвобождением в окружающую среду ионов  $Ag^+$  (Таусарова Б.Р. и соавт., 2014; Шульгина Т.А., 2015). Использование наночастиц серебра (НЧ  $Ag$ ) в стоматологической практике показало их высокую активность в отношении микроорганизмов (Савин Е.И. и соавт., 2014; Трезубов В.Н. и соавт., 2010).

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 (Kim E.V. et al., 2021).

### **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. 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**

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.

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.

### **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 работы**

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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Общая структура экспериментального исследования

В данной главе представлены материалы и методы экспериментальных и исследований по разработке биорезорбируемой мембраны на полимерной основе, обработанной гидрозоле наночастиц серебра (PLA-FR–Ag) для повышения эффективности устранения дефектов костной ткани при использовании трансплантатов или имплантатов, методом направленной костной регенерации и изучения ее свойств.

Все исследования базировались на принципах доказательной медицины и проводились поэтапно на базе кафедры челюстно-лицевой хирургии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), лаборатории ООО «Фибрасофт» и ФГБУ «9 Лечебно-диагностический центр» Минобороны России.

Экспериментальные исследования согласно цели и задачам 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.

### Материалы и методы

#### 1. Методика получения мембраны на основе полилактида и фиброина шелка

В исследованиях применялась мембрана «полилактид-фиброин» (далее 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).

*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 37°C до концентрации 75 мг/мл.

*Изготовление мембраны.* Для изготовления мембраны использовали метод электроспиннинга. (Рисунок 1).

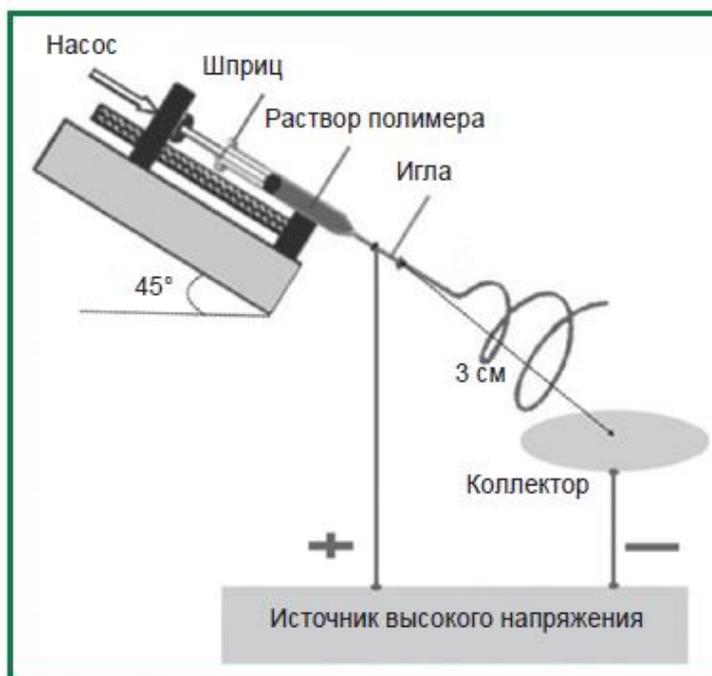


Рисунок 1 – Схема установки для изготовления мембраны из полилактида и фиброина шелка

В качестве растворителя использовался 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол-2, являющийся одним из часто применяемых растворителей для электроспиннинга вследствие его высокой летучести, что 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 1:1. Образец мембраны представлял собой равномерно распределенные по поверхности стекла волокна, уложенные в несколько слоев размером  $1 \times 1$  см в виде пленок толщиной 0,2-0,23 мм (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Внешний вид мембраны из полилактида и фиброина шелка, полученной методом электроспиннинга

Раствор полимера подавался из фильеры. Под действием электрического поля капля полимера вытягивалась в нить и укладывалась на плоский неподвижный электрод-коллектор. Расстояние до коллектора составляло 35 см, напряжение между электродами – 60 кВ. После изготовления матриксы 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.

## 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). Высушенные образцы покрывали слоем хрома толщиной 20 нм в атмосфере аргона при ионном токе 6 мА и давлении 0,1 мм рт. ст. с использованием прибора IonCoater IB-3 (Eiko Engineering, Япония) и анализировали на растровом электронном микроскопе «Tescan» «Vega 3SB» (Рисунок 3).

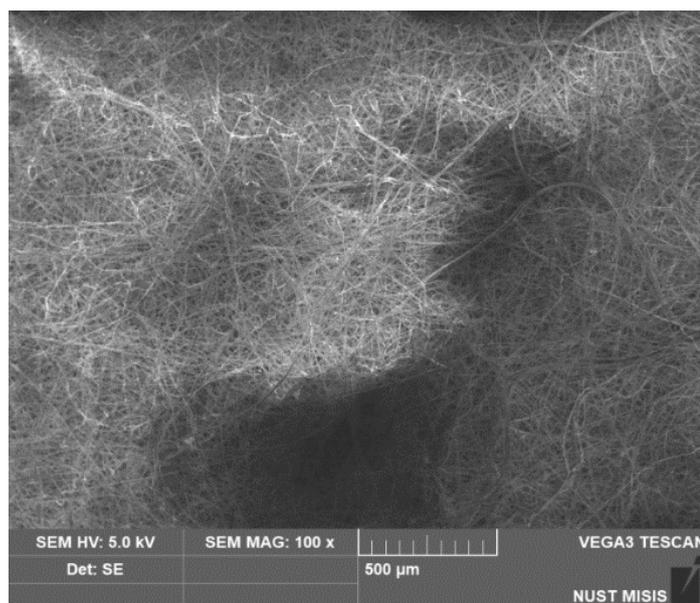


Рисунок 3 – Микрофотография мембраны «полилактид-фиброин» PLA-FR, полученная с помощью растрового электронного микроскопа «Tescan» «Vega 3SB»

### 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/л, 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 – анаэробной.

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

### 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 4).



Рисунок 4 – Внешний вид мембраны «Биопласт-Дент» (ЗАО «ОЭЗ «ВладМиВа», г. Белгород, Россия)

## 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 (Рисунок 5).

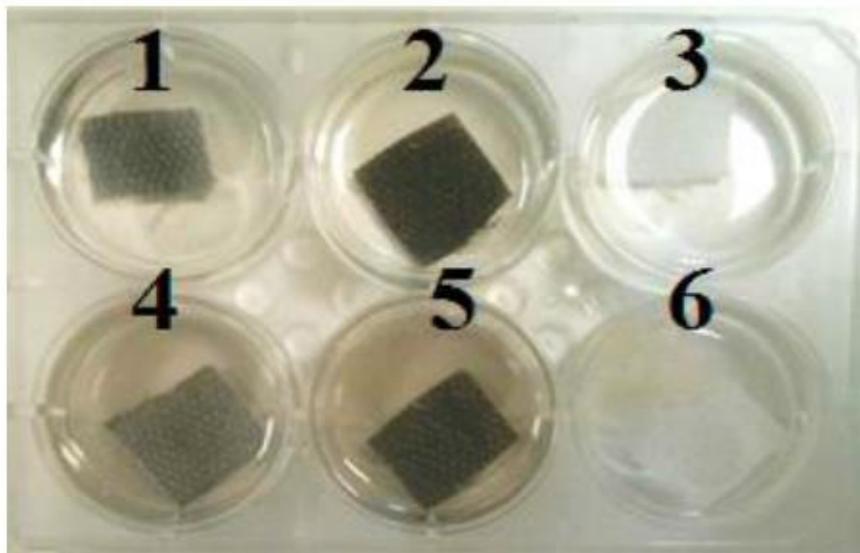


Рисунок 5 – Размещение образцов исследуемых мембран в лунках культурального планшета: №№1,4 – мембраны из «полилактид-фиброина» PLA-FR; №№2,5 – мембраны из «полилактид-фиброина» с наночастицами серебра PLA-FR-Ag; №№3,6 – мембрана «Биопласт-Дент»

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.

### Методики экспериментальных исследований мембран в условиях *in vitro*

#### 1. Исследование острой 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 наночастицы 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. Критерием острого токсического действия соединения являлась гибель 50 % и более рачков за 48 часов.

#### 2. Исследование цитотоксичности мембран

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

*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.

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

*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 (Ø 90 мм) (Рисунок б).

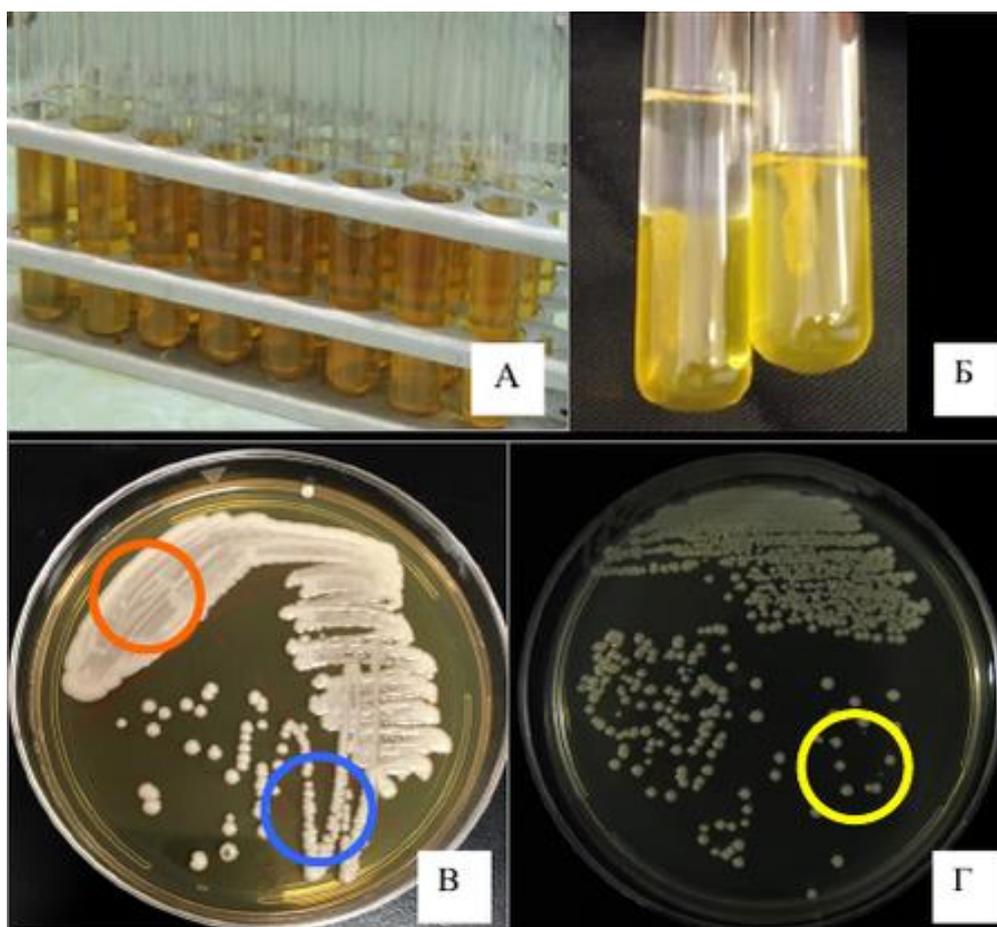


Рисунок б – Изучение антимикробной активности на суточных культурах штаммов микроорганизмов: а) сахарный бульон; б) бульонная культура с инкубированными в ней мембранами; в) зоны роста микроорганизмов на агаризованной питательной среде: сплошной рост (выделение красным цветом); скудный рост (выделение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

### *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 им. Д.И. Ивановского Минздрава России.

Образцы мембран PLA-FR-Ag и PLA-FR с зафиксированными клетками исследовали на микроскопе JSM – 50a 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.

### **3. Экспериментальные исследования мембран на моделях in vivo**

#### *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 +22<sup>0</sup>С. 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)

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 работы 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 1, Таблица 2).

Таблица 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 – 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

#### *Методики оперативного вмешательства*

Экспериментальных животных оперировали под внутривенным или внутрибрюшинным наркозом препарата «Золетил-100» (Франция). В качестве основного, в дозе 5 мг/кг на 5% растворе глюкозы, и поддерживающего внутримышечно раствор «Рометар» (США) 1мл 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 проведенных операций всем животным был введен антибиотик цефазолин (Sandoz, Австрия 25мг/кг).

Срок наблюдения по соответствующему протоколу составил 7, 14, 21, 28, 35, 42 дня. В указанные сроки выводили животных, проводили биопсию исследуемой области. Материал отправляли на гистологическое исследование.

#### *Исследование токсичности in vivo*

Эксперимент проводили на 9 самках белых крыс, массой 300-350 г. 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.

#### *Исследование регенерации костной ткани на критическом дефекте свода черепа кролика породы Шиншилла*

Животные были разделены на две группы: контрольную (n = 4) – имплантация полилактидной мембраны без наночастиц Ag (PLA-FR) и экспериментальную – имплантация полилактидной мембраны с покрытием наночастицами коллоидного Ag (PLA-FR–Ag) (n = 4)

Мембраны PLA-FR и PLA-FR–Ag устанавливали в область критического костного дефекта. Срок наблюдения составлял соответственно протоколу 14, 28, 42 дня. В указанные сроки выводили животных из эксперимента (8 животных выводились через 14 дней; 8 - через 28 дней; 8 - через 42 дня). В указанные сроки проведена биопсия.

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.

#### **4. Лабораторные методы исследования**

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

*Методы статистического анализа полученных результатов.* Экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). Определяли вариационные ряды, среднюю арифметическую, среднее квадратическое отклонения, среднюю ошибку и вероятность различий. Оценивали соответствие/ несоответствие результатов нормальному распределению Колмагорова–Смирнова. При отсутствии нормального распределения применяли непараметрический критерий F. Wilcoxon (Statistical Methods for Research Workers) с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

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.

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).

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 «10mm<sup>2</sup> SDD Detector - X-Act». Агрегаты наночастиц Ag были равномерно распределены по всему объему мембраны PLA-Ag. 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 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. Стандартным методом оценки жизнеспособности клеток являлась окраска остморральными красителями. 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% CO<sub>2</sub>. После определенного периода инкубации (24 ч и 72 ч) был проведен анализ роста ФЭЧ с помощью флуоресцентной микроскопии окрашенных клеток бромистым этидием. 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 РЭМ. Далее образцы с зафиксированными клетками ФЭЧ исследовали на микроскопе JSM – 50а 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 уплощались, 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. ruogene* (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±5,2%) и CD30 (14,1±3,6%), в том числе в межклеточном матриксе. Маркирование на CD15 показало слабую иммунопозитивную реакцию (3,4±1,2%). В экспериментальной группе PLA-Ag (n=4) все иммуномаркеры продемонстрировали слабую положительную реакцию: CD3 (6,5±3,1%), CD30 (3,1±1,4%), CD15 (1,2±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. 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 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 гидрозодем 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Леонтьев В.К. Антибактериальные свойства водных коллоидных растворов наночастиц металлов и оксидов металлов по отношению к бактериям зубного налета / В.К. Леонтьев, И.П. Погорельский, Г.А. Фролов, Я.Н. Карасенков, А.А. Гусев, Н.В. Латуца, **Л.Л. Бороздкин**, Д.С. Стефанцова // **Российские нанотехнологии**. – 2018. – Т. 13. – № 3–4. – С. 88–91.

2. Leont'ev V.K. Antibacterial Properties of Aqueous Colloid Solutions of Metal and Metal Oxide Nanoparticles against Dental Plaque Bacteria / V.K. Leont'ev, I.P. Pogorel'skii, G.A. Frolov, Ya. N. Karasenkov, A.A. Gusev, N.V. Latuta, **L.L. Borozdkin**, D.S. Stefantsova // **Nanotechnologies in Russia**. – 2018. – № 13. – P. 195–198. (**Scopus**)

3. Демяшкин Г.А. Иммуногистохимическая и морфологическая характеристика тканевого ответа на полилактидные мембраны с коллоидным серебром / Г.А. Демяшкин, Е.А. Шаламова, **Л.Л. Бороздкин**, З.С. Центроев, И.В. Иванова, С.Г. Ивашкевич, М.Г. Гевандова // **Медицинский вестник Северного Кавказа**. – 2019. – Т. 14. – № 4. – С. 664–667.

4. 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. (**Scopus**)

5. 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. (**Scopus**)

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

НЧ Ag – наночастицы серебра

РЭМ – растровая электронная микроскопия

ФЭЧ – фибробласты эмбрионов человека

EtBr – бромистый этидий

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