

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПОЛИМЕРНЫХ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ МЕМБРАН

А. Д. Коняева¹✉, Е. Ю. Варакута¹, А. Е. Лейман¹, Д. О. Рафиев¹, Е. Н. Большасов², К. С. Станкевич³

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

² Томский политехнический университет, Томск, Россия

³ Государственный университет штата Монтана, Бозмен, Монтана, США

Раневые дефекты слизистой оболочки рта являются распространенной патологией, для лечения которой разрабатывают покровные мембраны. Целью исследования было изучить морфологические особенности регенерации слизистой оболочки рта при применении полимерных пьезоэлектрических мембран. Исследование проведено на 45 крысах Wistar, разделенных на группы: 1) животные с открытым раневым дефектом; 2) животные с раневым дефектом, перекрытым полимерной мембраной с медным напылением; 3) интактные животные. Забор материала для морфометрического исследования проводили на 3-и, 7-е и 12-е сутки. На 3-и сутки в группе 1 удельная площадь грануляционной ткани была в 1,4 раза больше, чем в группе 2 ($p = 0,033$). Эндотелиоциты ее сосудов экспрессировали VEGF в большей степени в группе 2. В группе 2 происходило полное перекрытие дефекта эпителиальным пластом в отличие от группы 1. На 7-е сутки в группе 2 эпителий был в 2 раза толще, чем в группе 1 ($p = 0,019$). Грануляционная ткань замещалась рыхлой волокнистой соединительной тканью. В группе 1 преобладала удельная площадь воспалительной инфильтрации над рыхлой волокнистой соединительной тканью, экспрессия VEGF была ниже, чем в группе 2. На 12-е сутки в группе 2 преобладала рыхлая волокнистая соединительная ткань, экспрессия VEGF не отличалась от группы 3, отмечалось прорастание периферических нервов. В группе 1 удельная площадь плотной волокнистой ткани была в 3,9 раз больше, чем в группе 2 ($p = 0,012$), в эпителии имелись патологические изменения, а экспрессия VEGF была ниже контрольных значений. Таким образом, использование полимерной пьезоэлектрической мембраны благоприятно влияло на восстановление тканей слизистой оболочки полости рта в области раневого дефекта.

Ключевые слова: регенерация, раневой дефект, скаффолды, пьезоэлектрики, слизистая оболочка полости рта, воспаление

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №23-25-00346.

Вклад авторов: А. Д. Коняева, Е. Ю. Варакута, Е. Н. Большасов, К. С. Станкевич — концепция и дизайн исследования; А. Д. Коняева, А. Е. Лейман — сбор и обработка материала; А. Д. Коняева, Е. Ю. Варакута, Д. О. Рафиев — написание текста; А. Д. Коняева, Е. Ю. Варакута, Д. О. Рафиев, Е. Н. Большасов, К. С. Станкевич — редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (№ 7693/1 от 26 августа 2019 г.). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с директивой Европейского Парламента № 2010/63EU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей» и Хельсинской декларацией.

✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Денисовна Коняева
Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634034, Россия; asyakonya95@gmail.com

Статья получена: 18.05.2023 **Статья принята к печати:** 02.06.2023 **Опубликована онлайн:** 19.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.020

MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF REGENERATION OF ORAL MUCOSA ASSOCIATED WITH USE OF POLYMERIC PIEZOELECTRIC MEMBRANES

Koniaeva AD¹✉, Varakuta EYu¹, Leiman AE¹, Rafiev DO¹, Bolbasov EN², Stankevich KS³

¹ Human anatomy department, General medicine faculty, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

² National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

³ Chemistry and biochemistry faculty, Montana State University, Bozeman, MT, USA

Wound defects of the oral mucosa are a common pathology the treatment of which often involves synthetic membranes. Development of varieties of such membranes is an ongoing process. This study aimed to register morphological features of the oral mucosa regeneration process in the presence of one of the varieties, the polymer piezoelectric membranes. The study involved 45 Wistar rats divided into 3 groups: 1) animals with an open wound defect; 2) animals with a wound defect covered with a copper-coated polymer membrane; 3) intact animals. The samples for morphometric study were collected on the 3rd, 7th and 12th days. On the 3rd day, rats of group 1 had the specific area of granulation tissue 1.4 times greater than that in group 2 ($p = 0.033$). In group 1 rats, endotheliocytes expressed more VEGF than in the animals of group 2. In group 2, the defect was ultimately completely covered with the epithelial layer, which was not the case in group 1. On the 7th day, the epithelium in rats of group 2 was twice as thick as the layer registered in group 1 ($p = 0.019$). Granulation tissue was replaced by loose fibrous connective tissue. In group 1, the specific area of inflammatory infiltration was greater than that of loose fibrous connective tissue, and the VEGF expression level was lower than in group 2. On the 12th day, the predominant tissue in group 2 was the loose fibrous connective tissue, the VEGF expression level equaled that of group 3, and peripheral nerves began to grow. In group 1, the specific area of dense fibrous tissue was 3.9 times greater than that in group 2 ($p = 0.012$), the epithelium had pathological changes and the VEGF expression was below control values. Thus, a polymer piezoelectric membrane had a positive effect on the post-wound restoration of the oral mucosa tissues.

Keywords: regeneration, wound defect, scaffolds, piezoelectrics, oral mucosa, inflammation

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research under research project №23-25-00346.

Author contribution: Koniaeva AD, Varakuta EYu, Bolbasov EN, Stankevich KS — study concept and design; Koniaeva AD, Leiman AE — collection and processing of the material; Koniaeva AD, Varakuta EYu, Rafiev DO — text authoring; Koniaeva AD, Varakuta EYu, Rafiev DO, Bolbasov EN, and Stankevich KS — text editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Siberian State Medical University (Minutes № 7693/1 of August 26, 2019). All manipulations with the animals were done as prescribed by the Directive 2010/63/EU of the European Parliament of September 22, 2010 "On the protection of animals used for scientific purposes", and the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasiia D. Koniaeva
Moskovsky Trakt, 2, Tomsk, 634034, Russia; asyakonya95@gmail.com

Received: 18.05.2023 **Accepted:** 02.06.2023 **Published online:** 19.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.020

Регенерация раневого дефекта представляет собой сложный процесс взаимодействия между клетками эпителия, трофического аппарата, фибробластического ряда и воспалительной инфильтрации [1]. В ходе заживления происходят стадии воспаления, регенерации, реорганизации, на каждой из которых перечисленные компоненты имеют свои морфологические особенности рубца [2]. Для заживления посредством первичного натяжения необходимо, чтобы стадия воспаления в кратчайшие сроки перешла на стадию регенерации. В то время как для заживления вторичным натяжением, итогом которого является образование рубца, характерно превалирование воспалительной стадии [3].

Современным подходом ведения раневых дефектов слизистой оболочки рта является использование покровных материалов, которые обеспечивают защиту раневой поверхности от повторной травматизации. Поэтому актуальной задачей является поиск новых раневых повязок, которые не только будут защищать раневую дефект, но и, за счет дополнительных свойств, снижать выраженность воспалительных явлений и ускорять регенерацию [4].

Изучаемая полимерная пьезоэлектрическая мембрана была изготовлена в лаборатории гибридных материалов НИ ТПУ. Ее особенностью, помимо пьезоэлектрических свойств, является модификация при помощи ионов меди, которые обладают доказанными противомикробными и противовоспалительными свойствами [5].

Целью данного исследования было изучить морфологические особенности регенерации слизистой оболочки рта в условиях экспериментального раневого дефекта при применении полимерных пьезоэлектрических мембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 45-ти крысах-самцах линии Вистар, выведенных в виварии на базе ЦНИЛ СибГМУ. Животные содержались в стандартных условиях вивария, с ограничением приема пищи в течение суток после операции. Животные были разделены на три группы: экспериментальную группу 1 ($n = 15$), в которой у животных раневой дефект оставляли открытым согласно стандартному ведению раневого процесса в полости рта; экспериментальную группу 2 ($n = 15$), в которой раневой дефект перекрывали полимерной мембраной на основе винилиденфторида с тетрафторэтиленом, модифицированной медью; контрольную группу 3 ($n = 15$), в которой крысы имели интактную слизистую оболочку. Животных содержали в стандартных условиях вивария.

С целью моделирования раневого дефекта слизистой оболочки рта животные были введены в состояние наркоза в ходе внутримышечной инъекции препаратом «Золетил» в дозировке 0,3 мг. После антисептической обработки операционного поля 2%-м раствором хлоргексидина крысам был иссечен лоскут слизистой оболочки в области щеки размером 7 × 4 мм. Далее животным экспериментальной группы 2 по краям раны атравматичной иглой простыми узловыми швами фиксировали полимерную мембрану.

Выведение животных из эксперимента производили на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования путем введения в состояние гипоксии в CO₂-камере. После повторно иссекали слизистую оболочку щеки на месте раневого дефекта.

Приготовление гистологических препаратов осуществляли по общепринятой методике, просматривали их на световом микроскопе Observer D1 (Karl Zeuss; Германия) с использованием камеры для световой микроскопии AxioCam ICc5 (Karl Zeuss; Германия). Для этого после депарафинизации срезы окрашивали гематоксилином-эозином по стандартной методике.

Для иммуногистохимического исследования после приготовления серийных парафиновых срезов толщиной 4–6 мкм была проведена их депарафинизация, затем иммуногистохимическое окрашивание, для которого использовали кроличьи рекомбинантные поликлональные антитела VEGF и S-100 изотипа IgG (Abcam; США). Оценивали интенсивность иммуногистохимической окраски по четырехбалльной шкале: 0 — нет окрашивания, 1 — слабое окрашивание, 2 — умеренное окрашивание, 3 — сильное, 4 — очень сильное окрашивание.

Формула подсчета:

$$\text{Гистохимический индекс (H-score)} = \sum P(i) \times i,$$

где i — интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0–4, $P(i)$ — процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Подсчет проводили в трех когортах по 100 клеток в различных полях зрения (объектив ×40).

Для электронной микроскопии полученный материал помещали в 2,5%-й раствор глутарового альдегида на 0,2 М какодилатном буфере (1 : 9) для фиксации, постфиксировали в 1%-м растворе OsO₄ в холодильнике в течение 4 ч. Производили дегидратацию и заливали в смесь эпон и аралдита М.

Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5 (BROMMA; Швеция), контрастировали уранила ацетатом и цитратом свинца и изучали с помощью электронного микроскопа JEM -1400 CX (JEOL; Япония).

В основе морфометрического анализа лежали классические методы стереометрии. Подсчитывали показатели толщины эпителиального пласта, численной плотности фибробластов, удельной площади рыхлой и плотной волокнистой соединительной ткани, грануляционной ткани, воспалительной инфильтрации, используя программу обработки графических изображений Axio Vision (Karl Zeuss; Германия) и ImageJ, версия 1.52u (National institute of Public health; США).

На ультратонких срезах изучали ультраструктуру клеток эпителиального пласта, трофического аппарата, фибробластического ряда.

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 10.0 (IBM; США). Проверку статистических гипотез на характер распределения признака проводили при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. При обработке полученных результатов использовали методы описательной и непараметрической статистики. Исследуемые параметры описывали как медиану и квартили, $M(Q_1; Q_3)$. При сравнении независимых выборок использовали критерий Краскела–Уоллиса с медианным тестом, для парных сравнений — критерий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На 3-и сутки исследования в экспериментальной группе 1 наблюдали краевую эпителизацию раны, в то время как в группе 2 дефект был полностью перекрыт эпителием, в котором обнаруживались акантолитические пузырьки (рис. 1А).

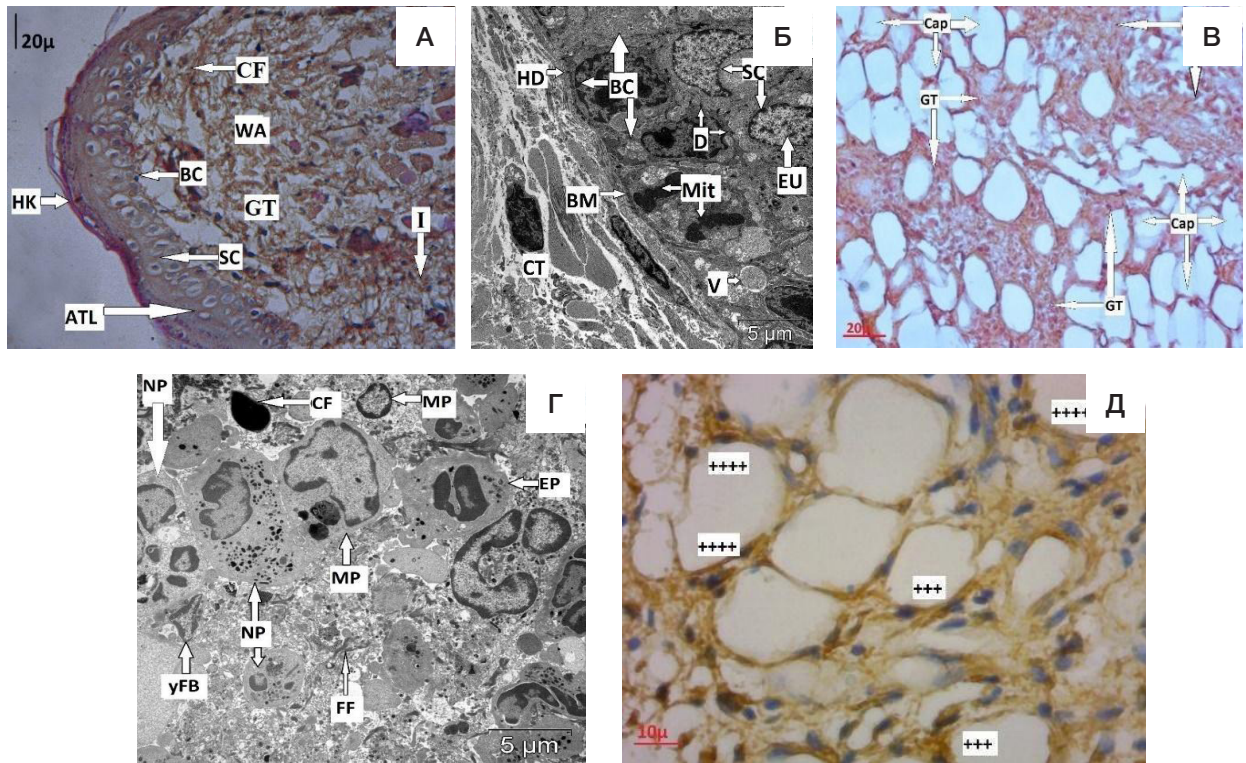


Рис. 1. Слизистая оболочка щеки крысы после нанесения экспериментального раневого дефекта на 3-и сутки исследования. **А.** Новообразованный тонкий эпителиальный пласт в области раневого дефекта и подлежащая грануляционная ткань. Патологические изменения в виде акантолиза. Экспериментальная группа 2; 3-и сутки исследования (окраска: гематоксилин, эозин; увеличение: 400). **Б.** Клетки базального слоя с признаками высокой пролиферативной активности и фигурами митоза. Экспериментальная группа 2, 3-и сутки исследования (ТЭМ; увеличение: 5000). **В.** Новообразованные сосуды грануляционной ткани. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. Экспериментальная группа 2, 3-и сутки исследования (окраска: гематоксилин, эозин; увеличение: 400). **Г.** Клеточная инфильтрация в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. Экспериментальная группа 1, 3-и сутки исследования (ТЭМ; увеличение: 5000). **Д.** Экспрессия VEGF в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрасивание ядер гематоксилином. Экспериментальная группа 2, 3-и сутки исследования (увеличение: 900)

На ультраструктурном уровне в обеих экспериментальных группах базальные клетки были вытянуты в ширину, апикально-базальная полярность не определялась. В группе 2 имелись признаки высокой пролиферативной активности, некоторые клетки находились в процессе митоза (рис. 1Б).

Была обнаружена область регенерации, заполненная грануляционной тканью с многочисленными тонкостенными сосудами (рис.1В). Удельная площадь грануляционной ткани в группе с покрытием была в 1,4 раз достоверно больше, чем в группе без него ($p = 0,033$) (см. таблицу). Здоровые ткани отделяла от раневого дефекта зона

Таблица. Морфологические показатели изменений в слизистой оболочке рта при регенерации раневого дефекта, М (Q₁; Q₃)

	Толщина эпителиального пласта, μ	Численная плотность фибробластов, у.е.	Удельная площадь грануляционной ткани, %	Удельная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани, %	Удельная площадь плотной волокнистой соединительной ткани, %	Удельная площадь воспалительной инфильтрации, %	VEGF
Контроль	203,9 (200,2; 204,4)	380,0 (376,0; 391,7)	-	92,3 (87,2; 95,4)	-	7,7 (5,2; 9,5)	80,0 (75,0; 85,0)
3-и сутки							
Группа 1	-	3782,0* (3721,0; 3849,5)	43,4 (39,4; 47,9)*	-	-	56,6 (50,3; 60,9)*	275,0 (265,0; 290,0)*
Группа 2	20,3 (19,1; 22,1)*	5378,5*# (5346,2; 5465,7)	60,8 (58,5; 62,6)*#	-	-	39,2 (37,3; 41,4)*#	375,0 (370,0; 380,0)*#
7-е сутки							
Группа 1	44,5 (43,2; 6,1)*	4530,5* (4472,5; 4579,7)	38,9 (35,8; 41,8)*	7,8 (6,3; 9,1)*	-	52,8 (49,9; 56,6)*	165,0 (155,0; 175,0)*
Группа 2	87,8 (85,7; 89,5)*#	6136,0** (6126,0; 6145,0)	41,6 (40,5; 43,5)*	35,1 (33,9; 35,9)*#	-	23,3 (21,9; 24,1)*#	275,0 (362,5; 282,5)*#
12-е сутки							
Группа 1	107,3 (106,2; 69,8)*	2746,5* (2639,0; 2906,0)	-	60,4 (52,5; 73,0)*	23,0 (14,3; 27,8)*	15,4 (11,4; 18,7)*	55,0 (55,0; 60,0)*
Группа 2	184,6 (183,4; 1856,0)#	397,5# (395,0; 402,0)	-	92,7 (92,5; 93,9)#	5,9 (5,5; 6,3)*#	1,4 (1,2; 1,9)*#	120,0 (125,0; 135,0)*#

Примечание: * — значимые различия с контрольной группой ($p < 0,05$); # — значимые различия с группой 1 ($p < 0,05$).

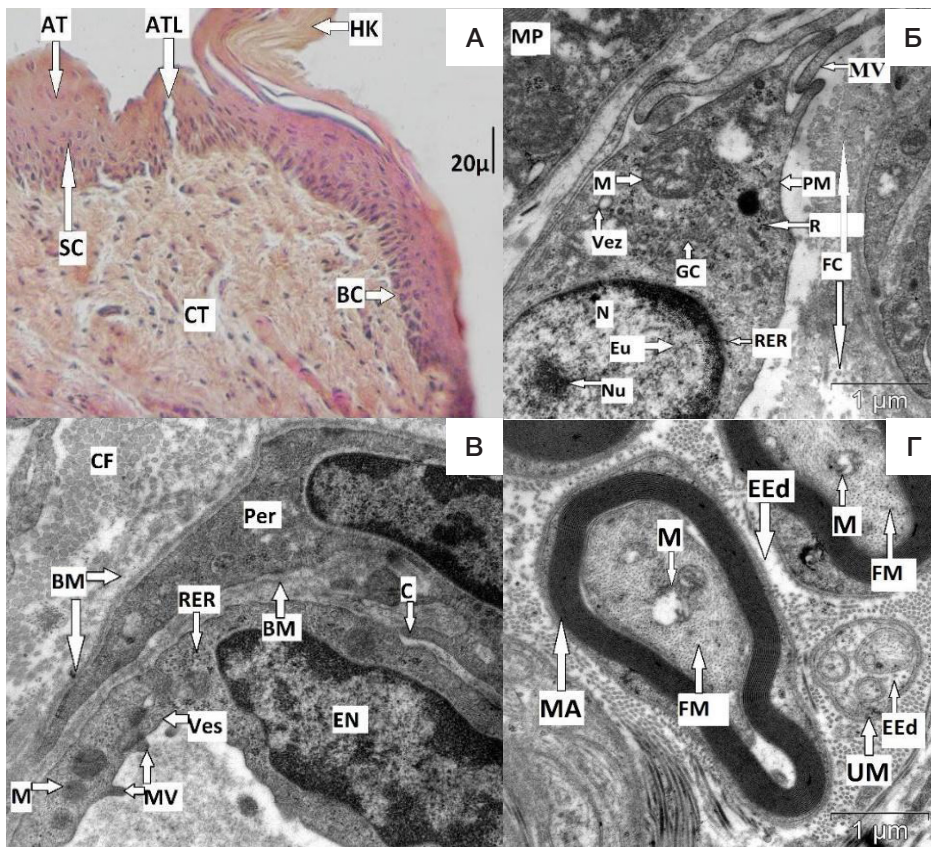


Рис. 2. Слизистая оболочка щеки крысы после нанесения экспериментального раневого дефекта на 7-е сутки исследования. **А.** Патологические изменения эпителия в области регенерирующего раневого дефекта: неравномерная толщина эпителиального пласта, утолщение шиповатого слоя, акантолиз. Экспериментальная группа 1, 7-е сутки исследования (окраска: гематоксилин, эозин; увеличение: 400). **Б.** Дифференцированный фибробласт, окруженный соединительнотканскими волокнами в области раневого дефекта. Экспериментальная группа 2, 7-е сутки исследования (ТЭМ; увеличение: 20 000). **В.** Интердигитация между эндотелиоцитом и перицитом капилляра на месте раневого дефекта. Экспериментальная группа 2 (ТЭМ; увеличение: 20 000). **Г.** Периферический нерв, содержащий миелиновые и безмиелиновые волокна с признаками периневрального и эндоневрального отека. Экспериментальная группа 2, 7-е сутки исследования (ТЭМ; увеличение: 20 000)

обширной воспалительной клеточной инфильтрации, удельная площадь которой в группе 2 была в 1,4 раз достоверно меньше, чем в группе 1 ($p = 0,017$). Она состояла из нейтрофилов, макрофагов, плазмоцитов, лимфоцитов и эозинофилов (см. таблицу) (рис. 1Г).

Численная плотность фибробластов в 1 мм² среза была достоверно выше в группе 2 ($p = 0,035$) (см. таблицу). Кроме того, у животных этой группы были выявлены отдельные пучки соединительнотканских волокон (рис. 1А).

В области раневого дефекта обнаружены новообразованные тонкостенные сосуды грануляционной ткани. Их эндотелиоциты активно экспрессировали VEGF (рис. 1Д). При этом подсчитываемый показатель H-score в группе 2 был в 1,4 и 4,7 раз достоверно больше, чем в группе 1 и контрольной группе ($p = 0,029$, $p = 0,019$) (см. таблицу).

Эндотелиальная выстилка и базальная мембрана капилляров грануляционной ткани были тонкими, межэндотелиальные пространства расширенными. Эндотелиоциты бедны органеллами. В группе с покрытием в области люминального края сосудов в эндотелиоцитах визуализировалось большое количество микропиноцитозных пузырьков и многочисленные микроворсинки.

На 7-е сутки исследования во всех экспериментальных группах эпителий полностью перекрывал раневой дефект. В 1-й экспериментальной группе толщина эпителиального пласта была достоверно ниже, чем в интактной слизистой оболочке и во 2-й группе (таблица), были выражены акантолитические процессы (рис. 2А).

В группе 2 патологические изменения эпителия были выражены в меньшей степени, чем в группе без покрытия. Начиная определяться типичный рельеф в виде сосочков в сторону соединительной ткани. Тем не менее, встречались участки с акантозом и акантолизом. Толщина эпителия была в 2,3 раза значимо меньше, чем в контрольной группе ($p = 0,023$), но в 2 раза достоверно больше, чем в группе без покрытия ($p = 0,019$) (см. таблицу). Базальные клетки постепенно приобретали типичную вытянутую в высоту форму и апикально-базальную полярность, восстанавливались контакты с базальной мембраной в виде полудесмосом.

В собственной пластинке слизистой оболочки щеки на месте раневого дефекта во всех экспериментальных группах определялись участки со сформированной рыхлой волокнистой соединительной тканью. Ее удельная площадь в группе 2 была значимо больше в 4,5 раза ($p = 0,041$), чем в группе 1, но в 2,6 раз достоверно меньше, чем в группе контроля ($p = 0,034$).

В группе с покрытием численная плотность фибробластов увеличивалась по сравнению с группой без него в 1,35 раз ($p = 0,041$). В группе с покрытием преобладали крупные дифференцированные фибробласты отростчатой формы с высокой синтетической активностью. Их плазматическая мембрана образовывала многочисленные выросты. В окружении клеток обнаружены пучки соединительнотканских волокон, расположенные в разных плоскостях (рис. 2Б). В группе без покрытия по-прежнему преобладали юные фибробласты, ультраструктура которых

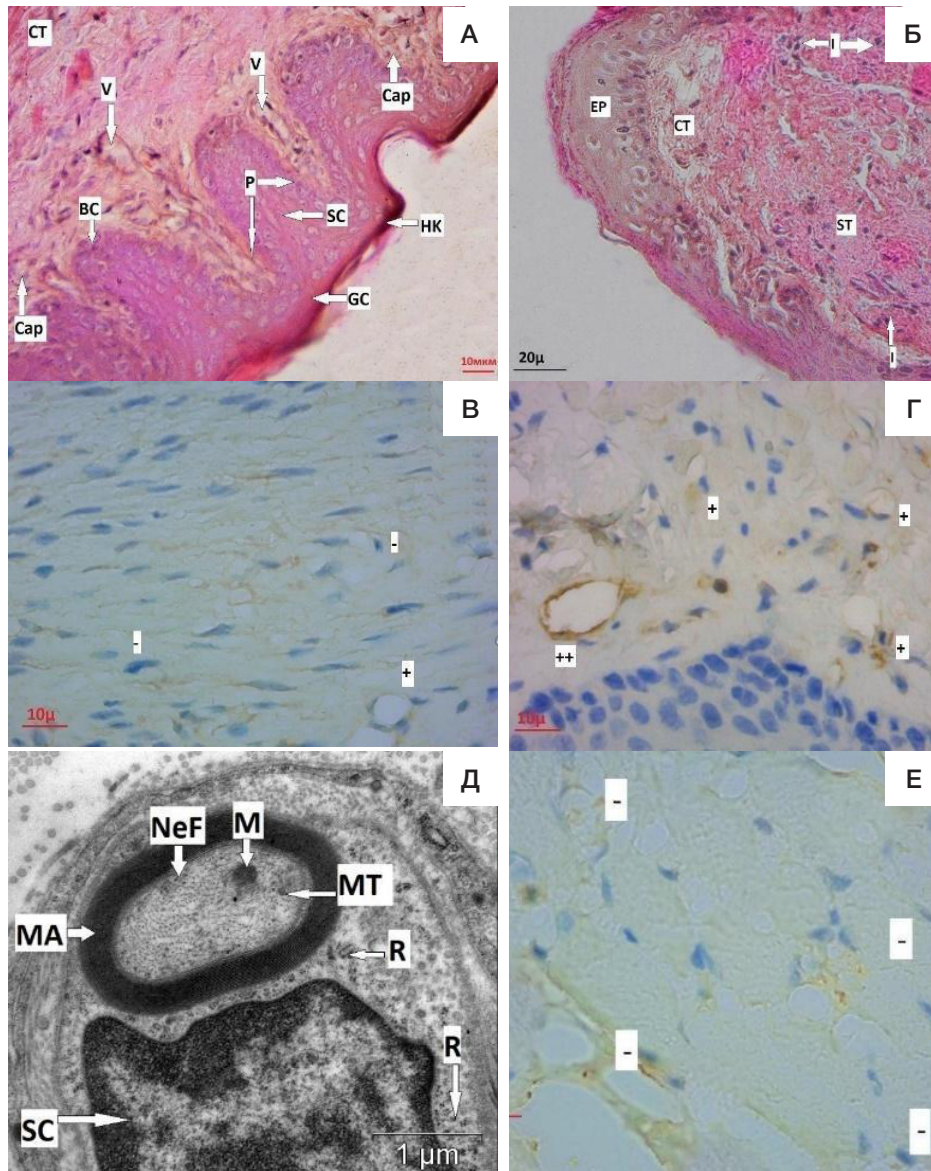


Рис. 3. Слизистая оболочка щеки крысы после нанесения экспериментального раневого дефекта на 12-е сутки исследования. **А.** Восстановленная слизистая оболочка. Экспериментальная группа 2, 12-е сутки исследования (окраска: гематоксилин, эозин; увеличение: 400). **Б.** Рубцовые изменения на месте раневого дефекта. Экспериментальная группа 1, 12-е сутки исследования (окраска: гематоксилин, эозин; увеличение: 400). **В, Г.** Экспрессия VEGF в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрасивание ядер гематоксилином. **В.** Экспериментальная группа 1. Экспериментальная группа 2, 12-е сутки исследования (увеличение: 900). **Д.** Периферический нерв, содержащий миелиновые волокна без признаков периневрального и эндоневрального отека в области раневого дефекта. Экспериментальная группа 2 (увеличение: 20 000). **Е.** Отсутствие экспрессии S-100 в собственной пластинке слизистой оболочки полости рта, докрасивание ядер гематоксилином. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. Экспериментальная группа 1, 12-е сутки исследования (увеличение: 900). WA — область раневого дефекта; CT — рыхлая волокнистая соединительная ткань; GT — грануляционная ткань; ST — плотная волокнистая соединительная ткань; I — инфильтрация; V — венула; Cap — капилляр; EP — эпителий; BM — базальная мембрана; BC — базальные клетки; SC — шиповатые клетки; GC — клетки поверхностного слоя; HK — роговой слой; ATL — акантолиз; AT — акантоз; P — сосочки; D — десмосомы; HD — полудесмосомы; Va — расширение межклеточного пространства; PM — плазматическая мембрана; EU — эухроматин; N — ядро; Nu — ядрышко; Vez — везикулы; C — межклеточный контакт; Mit — митоз; yFB — молодой фибробласт; MP — макрофаг; NP — нейтрофил; EP — эозинофил; FC — соединительнотканьные волокна; EN — эндотелиоцит; Per — перицит; FF — фрагменты соединительнотканьных волокон; CF — деструктивно измененные клетки; CF — коллагеновые волокна; PN — периферический нерв; MA — миелиновое нервное волокно; UM — безмиелиновое нервное волокно; PEd — отек периневрального пространства; EEd — отек эндоневрального пространства; FM — нейрофиламенты и микротрубочки; + — слабое окрашивание; ++ — умеренное окрашивание; +++ — сильное окрашивание; ++++ — очень сильное окрашивание; — — нет окрашивания

практически не изменилась по сравнению с результатами 3-х суток.

У новообразованных сосудов экспрессия VEGF в группе 2 была в 1,7 и 3,6 раз достоверно больше, чем в группе 1 и в контрольной ($p = 0,022$, $p = 0,015$) (см. таблицу).

В группе 1 на ультраструктурном уровне в эндотелиоцитах по-прежнему встречались признаки нарушения транскапиллярного обмена в отличие от группы 2 (рис. 2В). В группе 2 базальная мембрана сосудов становилась непрерывной, равномерной по толщине.

На границе с раневым дефектом во всех экспериментальных группах выявлены периферические нервы, располагающиеся недалеко от кровеносных сосудов. В отростках нервных клеток определены единичные отечные митохондрии с деструкцией крист. Отмечен отек периневрального и эндоневрального пространства (рис. 2Г).

На 12-е сутки исследования в группе 2 толщина эпителиального пласта восстанавливалась, тогда как в группе 1 она была значимо меньше, чем в интактной

слизистой оболочке (см. таблицу). Патологические процессы в эпителии в группе 2 отсутствовали, подлежащая соединительная ткань вдавалась в эпителий, образуя выраженные сосочки, содержащие сосуды микроциркуляторного русла (рис. 3А). В группе 1 обнаружены явления акантолиза, что на ультраструктурном уровне выражалось в наличии вакуолей в межклеточном пространстве и акантоза в шиповатом слое за счет пролиферации клеток (рис. 3Б).

На 12-е сутки исследования во всех экспериментальных группах исчезла грануляционная ткань, вместо нее появилась молодая рыхлая волокнистая соединительная ткань (рис. 3А). Ее удельная площадь достигала контрольных значений только в группе с покрытием. В группе без покрытия между соединительнотканевыми волокнами обнаружены участки с внутритканевым отеком, встречались очаги с рубцовыми изменениями, основу которых составляла плотная волокнистая соединительная ткань (рис. 3Б). Ее максимальная удельная площадь была зафиксирована в группе, где не использовали раневое покрытие (см. таблицу).

Численная плотность фибробластов в группе с раневым покрытием достигала контрольных значений и была в 6,9 раз достоверно меньше, чем в группе без него ($p = 0,032$). В группе 2 преобладали зрелые функционально неактивные клетки — фиброциты. Экстрацеллюлярный отек вокруг клеток не определялся, зато визуализировались четко организованные коллагеновые волокна. В группе 1 по-прежнему преобладали отростчатые клетки с развитыми органеллами синтеза и дисперсным хроматином.

В группе с покрытием визуализировались зрелые сформированные сосуды микроциркуляторного русла без явлений сладжа, стаза и тромбоза. Сосуды были окружены структурированными волокнами соединительной ткани, периваскулярный отек отсутствовал. Базальная мембрана была непрерывной, равномерной толщины. Органеллы были представлены в достаточном количестве, имели типичную структуру. Активно протекал транскапиллярный обмен. В группе 1 базальная мембрана капилляров была тонкая, у эндотелиоцитов зафиксировано небольшое количество микроворсинок и микропиноцитозных пузырьков, окруженных периваскулярным отеком.

Экспрессия VEGF снижалась по сравнению с 7-ми сутками во всех экспериментальных группах. Индекс H-score VEGF в экспериментальной группе 1 становился в 1,45 раз меньше контрольных значений ($p = 0,026$) (рис. 3В, Г).

Только в группе с раневым покрытием в области раневого дефекта отмечены периферические нервы с безмиелиновыми нервными волокнами (рис. 3Д). Несмотря на это, иммуногистохимическое исследование не выявило экспрессию маркера S-100, что свидетельствовало о начальных стадиях восстановления нервного аппарата (рис. 3Е).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящего исследования были показаны основные морфологические аспекты восстановления тканей слизистой оболочки рта при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны, модифицированной медью.

Так, уже на 3-и сутки исследования в группе с раневым покрытием раневой дефект был полностью перекрыт тонким слоем эпителия в отличие от группы без лечения, где наблюдалась краевая эпителизация.

Процесс эпителизации сопровождался изменениями на ультраструктурном уровне, благодаря которым могла происходить миграция эпителиоцитов от краев к центру раны [6]. Сохранение единичных десмосомных контактов наблюдал в своих работах Rorth, который объяснил их наличие необходимостью скоординированной коллективной миграции эпителия [7].

Высокая пролиферативная активность клеток базального слоя обнаружена только в группе с покрытием. В группе без раневого покрытия мы наблюдали отсутствие ультраструктурных признаков высокой пролиферативной активности. Отсутствие признаков высокой пролиферативной активности у клеток базального слоя может быть связано с тем, что мигрирующие клетки не способны делиться до момента полного перекрытия раневого дефекта слоем эпителия из-за снижения содержания циклинов G1/S-фаз и усиления активности циклинзависимой киназы [8].

Первый этап заживления ран протекал с преобладанием воспалительной реакции первые трое суток. Она была направлена на ограничение дефекта, содержащего некротические ткани, микроорганизмы и элементы первичной контаминации от здоровых тканей, удаление этих патологических продуктов, ликвидацию последствий повреждения, а также активацию цитокинов и факторов роста [9]. В связи с этим во всех экспериментальных группах наблюдалось увеличение удельной площади воспалительной инфильтрации.

Параллельно с воспалительной реакцией происходило формирование молодой грануляционной ткани с большим количеством новообразованных сосудов. При этом в группе с раневым покрытием соотношение удельной площади грануляционной ткани и воспалительной инфильтрации смещалось в сторону первого показателя, а в группе без лечения — в сторону второго, что свидетельствовало о преобладании воспалительных процессов над регенераторными.

Развитие грануляционной ткани способствовало отторжению мертвого субстрата, являлось барьером для предотвращения распространения микроорганизмов, а также становилось основой для формирования молодой соединительной ткани на последующих стадиях регенерации раны [10].

Базисным механизмом заживления раны был неангеогенез [11]. Во всех экспериментальных группах происходило активное образование капилляров в грануляционной ткани. Неангиогенез и воспалительная реакция способствовали высвобождению эндотелием и клетками воспалительного инфильтрата проангиогенных молекул — фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и хемокинов, необходимых для обеспечения роста капилляров. Ранее было отмечено, что присутствие VEGF в области регенерирующего раневого дефекта также поддерживало воспалительный ответ и увеличивало проницаемость сосудов, что дополнительно способствовало отеку окружающих тканей [12]. В нашем исследовании экспрессия VEGF увеличивалась во всех экспериментальных группах, особенно с раневым покрытием, что указывало на более интенсивное сосудобразование при отсутствии воздействий со стороны агрессивных факторов ротовой полости.

На 7-й день исследования доминирующим процессом становилась пролиферация, основную роль в которой играли фибробласты, отвечавшие за синтез коллагена и сокращение площади раны [13]. Они секретировали

экстрацеллюлярный матрикс, заменяющий матрикс фибрина [14], в связи с чем происходило усиление их синтетической активности, что обнаруживалось на ультраструктурном уровне в экспериментальной группе 2. Благодаря их присутствию в области раневого дефекта отмечалось значимое увеличение удельной площади рыхлой волокнистой соединительной ткани по сравнению с экспериментальной группой 1, в которой, по данным электронной микроскопии, в основном появлялись юные фибробласты с низкой синтетической активностью.

На 7-е сутки уменьшилась удельная площадь грануляционной ткани, в связи с чем новообразованные сосуды претерпевали изменения на ультраструктурном уровне и по данным иммуногистохимического исследования. Достоверно снижалась экспрессия VEGF для группы 1 по сравнению с группой 2, что стало предпосылкой к дальнейшему недостатку кровоснабжения в области раневого дефекта [15].

Для стадии пролиферации были характерны дифференцировка клеток эпителия и утолщение его слоев. На ультраструктурном уровне в группе 2 восстанавливались апикально-базальная полярность базального слоя, десмосомные контакты между клетками и полудесмосомы с базальной мембраной. Были обнаружены также признаки нарастающей пролиферации. Во всех экспериментальных группах выявлены патологические изменения в виде акантоза и акантолиза, что морфологически проявлялось наличием тканевого детрита в межклеточном пространстве и утолщением шиповатого слоя. Эти патологические признаки были больше выражены в группе без покрытия.

Следующим этапом регенерации раны, наступавшим на 12-е сутки, была рубцовая реорганизация. В группах с покрытием, в отличие от экспериментальной группы 1, преобладала удельная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани над рубцовой, а также наблюдались преимущественно синтетически не активные фиброциты.

На 12-е сутки происходило уменьшение количества сосудов микроциркуляторного русла во всех экспериментальных группах. Уменьшение количества новообразованных сосудов микроциркуляторного русла связывают с их регрессией в результате избирательного апоптоза на фоне усиления выработки антиангиогенных и снижения проангиогенных факторов, таких как VEGF [12]. В подтверждение этому мы наблюдали, что в экспериментальной группе 1 экспрессия VEGF была значимо ниже, чем в интактной слизистой оболочке. Это свидетельствовало об ухудшении кровоснабжения ткани на месте раневого дефекта, что является одной из основных причин рубцовой деформации [16]. В группе с покрытием экспрессия маркеров сосудобразования была выше контрольных значений.

На 12-е сутки, по данным электронной микроскопии, в группе с раневым покрытием визуализировались периферические нервы, содержащие безмиелиновые нервные волокна, в группе без него они не определялись. Также в группе 1 по краям от раневого дефекта были

обнаружены периферические нервы с признаками периневрального и эндоневрального отека, в аксонах которых визуализировались митохондрии с деструкцией крист. Исследование экспрессии белка периферических нервов S-100 показывало отрицательные результаты во всех группах, что свидетельствовало о начальных стадиях прорастания нервных волокон в область раневого дефекта.

Полное восстановление толщины и количества слоев эпителия в группе с покрытием происходило благодаря защите его от микроорганизмов. При нарушении целостности эпителиального пласта в случае открытой раны микроорганизмы проникали на дно дефекта, их экзотоксины воздействовали на рану как изнутри, так и снаружи, вызывая апоптоз эпителиоцитов и нарушая их пролиферацию и миграцию, что было связано с феноменом коллективной регуляции экспрессии генов бактерий в биопленке, который повышал их резистентность и способность к колонизации [17]. Кроме того, продукты метаболизма микроорганизмов вызывали в эпителиоцитах усиленную выработку провоспалительных медиаторов через толл-подобные рецепторы [18]. В результате этого мы наблюдали истончение эпителиального пласта и снижение количества его слоев в группе без покрытия, а также сохранение таких патологических изменений, как акантоз и акантолиз.

ВЫВОДЫ

Использование полимерной мембраны способствует полному перекрытию эпителиального пласта уже на 3-и сутки исследования и отсутствию патологических изменений на 12-е сутки. В то время как в группе без нее эпителизация раны наступала только на 7-е сутки, а патологические изменения в виде акантоза и акантолиза визуализировались на 12-е.

При использовании полимерной мембраны происходило более интенсивное замещение грануляционной ткани на рыхлую волокнистую соединительную ткань и наблюдалась меньшая выраженность воспалительной инфильтрации и рубцовых изменений. В то время как в группе без покрытия к моменту окончания исследования преобладала плотная волокнистая соединительная ткань и наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация.

При использовании полимерной мембраны ускорялся неоангиогенез, что выражалось в более интенсивной экспрессии маркера VEGF на каждой точке исследования по сравнению с группой, где покрытие не использовалось.

В целом, исследование показало, что использование полимерной пьезоэлектрической мембраны благоприятно влияло на восстановление тканей слизистой оболочки рта в области раневого дефекта, что сопровождалось ускоренным восстановлением эпителия, трофического аппарата и соединительнотканного компонента. В дальнейшем это способствует оптимизации процесса лечения ран данной локализации и улучшению качества жизни пациентов.

Литература

1. Hakkinen L, Koivisto L, Heino J, Larjava H. Cell and molecular biology of wound healing. In: A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, M. Ramalingam, editors. Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York: Elsevier, Academic Press, 2015; p. 669–90.
2. Ridiandries A, Tan JTM, Bursill CA. The role of chemokines in wound healing. Int J Mol Sci. 2018; 19 (10): 3217. DOI: 10.3390/ijms19103217.

3. Ozgok Kangal MK, Regan JP. Wound Healing. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. PMID: 30571027. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535406/>.
4. Zeng Q, Qi X, Shi G, Zhang M, Haick H. Wound dressing: from nanomaterials to diagnostic dressings and healing evaluations. *ACS Nano*. 2022; 16 (2): 1708–33. DOI: 10.1021/acsnano.1c08411.
5. Badaraev A, Koniaeva A, Krikova SA, Shesterikov E, Bolbasov E, Nemoykina AL, et al. Piezoelectric polymer membranes with thin antibacterial coating for the regeneration of oral mucosa. *Applied Surface Science*. 2020; 504: 144068. DOI: 0.1016/j.apsusc.2019.144068.
6. Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, Pierdomenico SD, Trubiani O, Pizzicannella J, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): The type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis. *Cells*. 2021; 10 (7): 1587. DOI: 10.3390/cells10071587.
7. Rørth P. Collective cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*. 2009; 25: 407–29. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113231.
8. Wehrhan F, Schultze-Mosgau S, Schliephake H. Salient features of the oral mucosa. In: Hom DB, Hebda PA, Gosain AK, Friedman CD, editors. *Essential tissue healing of the face and neck*. Shelton (CT): People's Medical Publishing House. BC Decker Inc., 2009; p. 83–99.
9. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev*. 2019; 99 (1): 665–706. DOI: 10.1152/physrev.00067.2017.
10. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical researches*. 2009; 37 (5): 1528–42. DOI: 10.1177/147323000903700531.
11. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019; 146: 97–125. DOI: 10.1016/j.addr.2018.09.010.
12. Koniaeva AD, Varakuta EY, Leiman AE, Bolbasov E, Stankevich K. Restoration of the microvasculature and hemodynamics in the oral mucosa wound defects area with and without a piezoelectric polymer membrane. *Clinical and experimental morphology*. 2022; 11: 56–66. DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.56-66.
13. Jiang D, Christ S, Correa-Gallegos D, Ramesh P, Kalgudde Gopal S, et al. Injury triggers fascia fibroblast collective cell migration to drive scar formation through N-cadherin. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 5653. DOI: 10.1038/s41467-020-19425-1.
14. Rognoni E, Pisco AO, Hiratsuka T, Sipilä KH, Belmonte JM, Mobasser SA, et al. Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing. *Mol Syst Biol*. 2018; 14 (8): e8174. DOI: 10.15252/msb.20178174.
15. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009; 153 (2): 347–58. DOI: 10.1016/j.jss.2008.04.023.
16. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*. 2010; 20 (9): 556–67. DOI: 10.1016/j.tcb.2010.06.006.
17. Waasdorp M, Krom BP, Bikker FJ, van Zuijlen PPM, Niessen FB, Gibbs S. The bigger picture: why oral mucosa heals better than skin. *Biomolecules*. 2021; 11 (8): 1165. DOI: 10.3390/biom11081165.
18. Smith P, Martinez C. Wound healing in the oral mucosa. In: Cham LA, editor. *Oral mucosa in health and disease: a concise handbook*. Bergmeier–Switzerland: Springer Int. Publ. AG, 2018; p. 77–91.

References

1. Hakkinen L, Koivisto L, Heino J, Larjava H. Cell and molecular biology of wound Healing. In: A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, M. Ramalingam, editors. *Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences*. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York: Elsevier, Academic Press, 2015; p. 669–90.
2. Ridiandries A, Tan JTM, Bursill CA. The role of chemokines in wound healing. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (10): 3217. DOI: 10.3390/ijms19103217.
3. Ozgok Kangal MK, Regan JP. Wound Healing. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. PMID: 30571027. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535406/>.
4. Zeng Q, Qi X, Shi G, Zhang M, Haick H. Wound dressing: from nanomaterials to diagnostic dressings and healing evaluations. *ACS Nano*. 2022; 16 (2): 1708–33. DOI: 10.1021/acsnano.1c08411.
5. Badaraev A, Koniaeva A, Krikova SA, Shesterikov E, Bolbasov E, Nemoykina AL, et al. Piezoelectric polymer membranes with thin antibacterial coating for the regeneration of oral mucosa. *Applied Surface Science*. 2020; 504: 144068. DOI: 0.1016/j.apsusc.2019.144068.
6. Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, Pierdomenico SD, Trubiani O, Pizzicannella J, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): The type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis. *Cells*. 2021; 10 (7): 1587. DOI: 10.3390/cells10071587.
7. Rørth P. Collective cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*. 2009; 25: 407–29. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113231.
8. Wehrhan F, Schultze-Mosgau S, Schliephake H. Salient features of the oral mucosa. In: Hom DB, Hebda PA, Gosain AK, Friedman CD, editors. *Essential tissue healing of the face and neck*. Shelton (CT): People's Medical Publishing House. BC Decker Inc., 2009; p. 83–99.
9. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev*. 2019; 99 (1): 665–706. DOI: 10.1152/physrev.00067.2017.
10. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical researches*. 2009; 37 (5): 1528–42. DOI: 10.1177/147323000903700531.
11. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019; 146: 97–125. DOI: 10.1016/j.addr.2018.09.010.
12. Koniaeva AD, Varakuta EY, Leiman AE, Bolbasov E, Stankevich K. Restoration of the microvasculature and hemodynamics in the oral mucosa wound defects area with and without a piezoelectric polymer membrane. *Clinical and experimental morphology*. 2022; 11: 56–66. DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.56-66.
13. Jiang D, Christ S, Correa-Gallegos D, Ramesh P, Kalgudde Gopal S, et al. Injury triggers fascia fibroblast collective cell migration to drive scar formation through N-cadherin. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 5653. DOI: 10.1038/s41467-020-19425-1.
14. Rognoni E, Pisco AO, Hiratsuka T, Sipilä KH, Belmonte JM, Mobasser SA, et al. Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing. *Mol Syst Biol*. 2018; 14 (8): e8174. DOI: 10.15252/msb.20178174.
15. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009; 153 (2): 347–58. DOI: 10.1016/j.jss.2008.04.023.
16. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*. 2010; 20 (9): 556–67. DOI: 10.1016/j.tcb.2010.06.006.
17. Waasdorp M, Krom BP, Bikker FJ, van Zuijlen PPM, Niessen FB, Gibbs S. The bigger picture: why oral mucosa heals better than skin. *Biomolecules*. 2021; 11 (8): 1165. DOI: 10.3390/biom11081165.
18. Smith P, Martinez C. Wound healing in the oral mucosa. In: Cham LA, editor. *Oral mucosa in health and disease: a concise handbook*. Bergmeier–Switzerland: Springer Int. Publ. AG, 2018; p. 77–91.