

ВЛИЯНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ МЕМБРАН НА РАЗВИТИЕ ФИБРОЗА ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАН СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

А. Д. Коняева¹✉, Е. Ю. Варакута¹, А. Е. Лейман¹, Г. М. Кормашов¹, М. В. Федосова¹, Е. Н. Больбасов², К. С. Станкевич³

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

² Томский политехнический университет, Томск, Россия

³ Государственный университет штата Монтана, Бозмен, Монтана, США

Профилактика развития фиброза при регенерации раневых дефектов слизистой оболочки полости рта является актуальной проблемой в современной хирургической стоматологии. Целью исследования было провести морфологическую оценку влияния биосовместимых пьезоэлектрических мембран на формирование фиброзной ткани в процессе регенерации ран слизистой оболочки полости рта. Были проанализированы межклеточное взаимодействие макрофагов и фибробластов, а также изменения уровня экспрессии маркеров CD68 и TGFβ1 и их влияние на развитие фиброза в условиях использования биосовместимых полимерных мембран с пьезоэлектрическими свойствами на различных этапах регенерации раневых дефектов слизистой оболочки полости рта. Проведена сравнительная морфологическая оценка структур слизистой оболочки ротовой полости у животных с интактной слизистой оболочкой ($n = 15$), с открытым раневым дефектом ($n = 15$) и раной, перекрытой биосовместимой пьезоэлектрической мембраной ($n = 15$). Забор материала из области раневого дефекта осуществляли на 3-и, 7-е и 12-е сутки эксперимента, в аналогичные сроки отбирали материал у интактных животных. В группе с использованием биосовместимой мембраны в области дефекта выявлены признаки стадии пролиферации уже на 3-и сутки исследования, более быстрая смена макрофагальной инфильтрации на фибробластическую, снижение воспалительной реакции — на 7-е сутки и восстановление численной плотности макрофагов и фибробластов до интактных значений — на 12-е сутки. Выраженность экспрессии маркеров, прогнозирующих развитие фиброза, CD68 и TGFβ1, была ниже, чем в группе без использования мембраны. Наблюдалось уменьшение удельной площади плотной волокнистой соединительной ткани на микроскопическом уровне и выраженность деформации мягких тканей на макроскопическом уровне. В группе без раневого покрытия на всем протяжении эксперимента сохранялись обширная клеточная инфильтрация и усиленная экспрессия CD68 и TGFβ1, что приводило к преобладанию удельной площади плотной волокнистой соединительной ткани над рыхлой соединительной тканью на 12-е сутки исследования и рубцовой деформации мягких тканей.

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

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

Вклад авторов: А. Д. Коняева, Е. Ю. Варакута, Е. Н. Больбасов, К. С. Станкевич — концепция и дизайн исследования; А. Д. Коняева, А. Е. Лейман, Г. М. Кормашов, М. В. Федосова — сбор и обработка материала; А. Д. Коняева, Е. Ю. Варакута — написание текста; А. Д. Коняева, Е. Ю. Варакута, Е. Н. Больбасов, К. С. Станкевич — редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено комитетом IACUC Сибирского государственного медицинского университета (протокол № 11-1 от 12 июля 2022 г.). Все манипуляции с крысами проводили в соответствии с Директивой Европейского Парламента № 2010/63 ЕС от 22.09.2010 «О защите животных, используемых в научных целях».

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

Статья получена: 18.06.2024 **Статья принята к печати:** 06.08.2024 **Опубликована онлайн:** 26.08.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.033

EFFECTS OF BIOCOMPATIBLE PIEZOELECTRIC MEMBRANES ON THE DEVELOPMENT OF FIBROSIS ASSOCIATED WITH THE ORAL MUCOSAL WOUND REGENERATION

Koniaeva AD¹✉, Varakuta EYu¹, Leiman AE¹, Kormashov GM¹, Fedosova MV¹, Bolbasov EN², Stankevich KS³

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

² Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

³ Montana State University, Bozeman, MT, USA

Prevention of fibrosis during the oral mucosal wound regeneration is a pressing issue of today's surgical dentistry. The study was aimed to perform morphological assessment of the effects of biocompatible piezoelectric membranes on fibrous tissue formation during regeneration of the oral mucosal wounds. We assessed cell-cell interactions of macrophages and fibroblasts, along with changes in the CD68 and TGFβ1 marker expression and their effects on the development of fibrosis under conditions of using biocompatible polymeric membranes with piezoelectric properties at various stages of the oral mucosal wound defect regeneration. Comparative morphological assessment of the oral mucosal structures was conducted in animals having intact mucosa ($n = 15$), having open wound defects ($n = 15$), and having wounds covered with biocompatible piezoelectric membranes ($n = 15$). Biomaterial was collected from the wound defect site on days 3, 7, and 12 of the experiment; collection of biomaterial from intact animals was performed on the same days. In the group, where biocompatible membranes were used, signs of proliferation phase at the defect site were detected as early as on day 3 of the study; the faster shift from macrophage infiltration to fibroblast infiltration, the decline in inflammatory response were detected on day 7; restoration of the numerical density of macrophages and fibroblasts to the intact values was detected on day 12. The expression of CD68 and TGFβ1, the prognostic markers of fibrosis, was lower in the group, where no membranes were used. Reduction of the dense fibrous connective tissue specific area was observed at the microscopic level, severe soft tissue deformation was reported at the macroscopic level. In the group with no wound covering, extensive cell infiltration and increased CD68 and TGFβ1 expression persisted throughout the experiment, which resulted in the fact that specific area of dense fibrous connective tissue was larger, than that of loose connective tissue, on day 12 of the study, as well as in the cicatricial soft tissue deformities.

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

Funding: the study was supported by the RSF (research project No. 23-25-00346)

Author contribution: Koniaeva AD, Varakuta EYu, Bolbasov EN, Stankevich KS — study concept and design; Koniaeva AD, Leiman AE, Kormashov GM, Fedosova MV — data acquisition and processing; Koniaeva AD, Varakuta EYu — manuscript writing; Koniaeva AD, Varakuta EYu, Bolbasov EN, Stankevich KS — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the IACUC of the Siberian State Medical University (protocol No. 11-1 dated 12 July 2022). Rats were handled in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes dated 22 September 2010.

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

Received: 18.06.2024 **Accepted:** 06.08.2024 **Published online:** 26.08.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.033

Фиброз является одним из возможных вариантов восстановления раневых дефектов слизистой оболочки полости рта [1]. Однако его наличие ведет к уменьшению объема мягких тканей, отрицательно сказывается на архитектонике поврежденной области и негативно влияет на дальнейшее стоматологическое лечение [2].

Еще на ранних стадиях регенерации раневых дефектов можно выделить ряд предикторов, анализ выраженности которых может спрогнозировать риск возникновения фиброза. Отмечается, что взаимоотношения клеток макрофагального и фибробластического ряда меняются в зависимости от стадии раневого процесса и вероятности риска возникновения фиброзных изменений [3].

Отражением развития фиброза является также выделение клеточными популяциями в области раневого дефекта трансформирующего фактора роста (TGF β). Он высвобождается фибробластами, макрофагами, а также другими клетками раневого ложа, на фоне повышения его экспрессии стимулируется образование грануляционной ткани, синтез коллагена и ангиогенез [4]. Однако выраженность его экспрессии и влияние на развитие плотной волокнистой соединительной ткани сильно зависят от микроокружения и клеточного контекста. TGF β либо стимулирует, либо ингибирует пролиферацию клеток. Он действует как хемоаттрактант для моноцитов и фибробластов, и его выраженная экспрессия во время первой стадии регенерации раны способствует развитию грануляционной ткани. Однако на завершающем этапе репарации повышенная экспрессия TGF β сопровождается выраженной клеточной инфильтрацией и снижением коллагенолиза [5]. Маркер активности макрофагов CD68 также может быть исследован для прогнозирования варианта заживления ран [6].

На основании анализа перечисленных показателей можно исследовать эффективность использования различных биосовместимых материалов для закрытия раневых дефектов.

В литературе отсутствуют сведения об изучении эффективности использования раневых покрытий со схожими физико-химическими свойствами для регенерации раневых дефектов слизистой оболочки полости рта.

Цель данного исследования — провести морфологическую оценку влияния биосовместимых пьезоэлектрических мембран на формирование фиброзной ткани в процессе регенерации ран слизистой оболочки полости рта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент представлял собой простое сравнительное исследование двух подходов при лечении раневых дефектов слизистой оболочки полости рта — с закрытием дефекта биосовместимым покрытием и без него.

Исследуемая в данной работе полимерная пьезоэлектрическая мембрана представляет собой нетканое полотно из сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом, изготовленное при помощи электроспиннинга. Мембрана состоит из двух слоев — гидрофильного, обращенного в сторону раневого дефекта, и гидрофобного наружного. Мембрана не является биodeградируемой, по завершении процесса регенерации она извлекается с поверхности зажившего раневого дефекта. Ранее проведенные исследования показали, что наличие пьезоэлектрических свойств у мембран по сравнению с диэлектрическими мембранами способствует

ускоренному образованию рыхлой волокнистой соединительной ткани с более низким показателем удельной площади плотной волокнистой соединительной ткани. Также было проведено исследование покрытий на биосовместимость и цитотоксичность при помощи фибробластов 3T3L1 лабораторией биополимеров и биотехнологий Томского государственного университета [7].

Всего в исследовании использовали 45 крыс линии Wistar (четырёхмесячных самцов массой 350 ± 30 г), по 15 животных в каждой группе. К 1-й группе ($n = 15$) относились животные с открытым раневым дефектом, ко 2-й ($n = 15$) — животные с раневым дефектом, перекрытым полимерной пьезоэлектрической мембраной, к 3-й ($n = 15$) — животные с интактной слизистой оболочкой. Животных распределяли по группам при помощи метода блочной рандомизации. Животные были предоставлены НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е. Д. Гольдберга (Томск, Россия). Эксперимент проводили после двухнедельного периода акклиматизации животных. Всех крыс содержали в стандартных условиях вивария: в отдельных подписанных клетках по пять особей в каждой с постоянным доступом к еде и воде начиная со вторых суток исследования при температуре от $+12$ до $+18$ °C по Цельсию [8].

Выбор в качестве объектов исследования этого вида животных был обусловлен рядом факторов: высокой степенью трансляции данных экспериментального моделирования по отношению к человеку, генетической однородностью (гомозиготностью), определяющей постоянство реакции на воздействие физико-химических, физиологических, биопатогенных и стрессовых факторов, известный уровень чувствительности к раздражителям; специфичностью и выраженностью биохимических, иммунологических, функциональных и морфологических показателей [9].

Для имитации раневого дефекта слизистой оболочки полости рта животным иссекался лоскут слизистой оболочки размером 7×4 мм из области щеки. После этого животным 2-й группы при помощи узловых швов фиксировали мембрану по краям раны. Все хирургические манипуляции над животными производили после введения их в состояние наркоза при помощи препарата «Золетил 100» в дозировке 10 мг/кг (Вирбак, Каррос; Франция). Критерии исключения животных из исследования с последующей эвтаназией — ухудшение их общего состояния, характеризующееся вялостью, апатией, отказом от еды, нарушениями сна или преждевременной смертью животного. Ни одно животное не было исключено из исследования.

Животных выводили из исследования на 3-е, 7-е и 12-е сутки (по пять особей для каждой группы) путем введения в состояние гипоксии в CO₂-камере.

Образцы тканей для гистологического исследования брали из области раневого дефекта, захватывая по 1 мм ткани с периферии. Полученные при аутопсии ткани фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина («Биовитрум»; Россия), промывали под проточной водой, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и изопропанолу («Биовитрум»; Россия) и заливали парафином («Биовитрум»; Россия). Изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм при помощи санного микротомы MC-1 (Орион-Медик, Россия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином («АБРИС+»; Россия) и пиррофуксином Ван Гизона («Биовитрум»; Россия). Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим.

Проводили качественную и количественную гистологическую оценку удельной площади волокнистой соединительной ткани, численной плотности макрофагов и фибробластов в 1 мм² среза. Гистологические срезы исследовали с помощью светопольного микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss AG; Германия) с объективом ×40 и ×90, окулярами ×10. Изучали по 50 полей зрения из области раневого дефекта в каждой группе.

Иммуногистохимическое окрашивание производили при помощи кроличьих рекомбинантных поликлональных антител CD68 и TGFβ I изотипа IgG (Abcam; США). Отмечали интенсивность иммуногистохимической окраски по McCarthy [10]: 0 — отсутствие окрашивания, 1 — слабое окрашивание, 2 — умеренное окрашивание, 3 — сильное, 4 — очень сильное окрашивание.

Формула подсчета:

$$\text{Histochemical scores} = \sum P(i) \times i,$$

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, ×90).

Обработку изображений выполняли с использованием программы Axio Vision 4.8.2 (Carl Zeiss AG; Германия) и ImageJ v.1.54u (Национальный институт здравоохранения, Мэриленд).

Для оценки ультраструктуры макрофагов и фибробластов изготавливали препараты для электронной микроскопии по стандартной методике: фиксировали ткани в 2,5%-м растворе глutarового альдегида и какодилатном буфере (0,2 M; 1 : 9), постфиксировали в 1%-м растворе тетраоксида осмия, осуществляли дегидратацию и заливку в смесь аралдита М и эпона. Использовали ультратом LKB-5 (BROMMA; Швеция) для изготовления срезов, контрастировали препараты уранил-ацетатом и цитратом свинца. Изучали ультраструктуру, используя электронный микроскоп JEOL JEM -1400 CX (Jeol; Япония).

Статистическая обработка

Для анализов *in vivo* использовали программное обеспечение Statistica версии 10.0 (StatSoft Inc.; США). Проводили проверку статистической гипотезы

Таблица 1. Морфологические показатели, характеризующие степень развития фиброза в слизистой оболочке полости рта при регенерации раневого дефекта, M(Q₁;Q₃)

	TGFβ	CD68	Численная плотность фибробластов, у.е.	Численная плотность макрофагов, у.е.	Удельная площадь плотной волокнистой соединительной ткани, %
Контроль	45,0 (40,0; 48,75)	50,0 (45,0; 55,0)	380,0 (376,0; 391,7)	163,0 (158,0; 165,0)	–
3-и сутки					
1-я группа	285,0 (276,25; 290,0)*	140,0 (135,0; 145,0)*	3782,0* (3721,0; 3849,5)	772,5* (750,2; 788,0)	–
2-я группа	200,0 (190,0; 205,0)*#	210,0 (205,0; 215,0)*#	5378,5*# (5346,2; 5465,7)	1750,0 *# (1735,2; 1785,5)	–
7-е сутки					
1-я группа	367,5 (351,25; 375,0)*	325,0 (320,0; 330,0)*	4530,5* (4472,5; 4579,7)	1846,0* (1831,2; 1869,0)	–
2-я группа	130,0 (125,0; 135,0)*#	280,0 (275,0; 285,0)*#	6136,0*# (6126,0; 6145,0)	1128,0*# (1118,5; 1145,7)	–
12-е сутки					
1-я группа	230,0 (225,0; 235,0)*	170,0 (165,0; 175,0)*	2746,5* (2639,0; 2906,0)	971,0* (947,0; 1138,2)	23,0 (14,3; 27,8)*
2-я группа	85,0 (80,0; 90,0)*#	85,0 (80,0; 90,0)*#	397,5# (395,0; 402,0)	147,5# (143,0; 149,7)	5,9 (5,5; 6,3)*#

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$); # — достоверные различия по сравнению с 1-й группой ($p < 0,05$)

распределения признаков с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Все результаты представлены как медиана и квартили, M (Q₁; Q₃). Непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с медианным тестом использовали для сравнения независимых выборок, для парных сравнений применяли критерий Уилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На 3-и сутки исследования в экспериментальных группах в области раневого дефекта наблюдалась грануляционная ткань, в группе с покрытием встречались отдельные пучки соединительнотканых волокон. В области раневого дефекта визуализировалась клеточная инфильтрация, представленная, в основном, нейтрофилами. Кроме того, определялись макрофаги и фибробласты, при этом в группе с покрытием они визуализировались чаще (рис. 1А). Так, численная плотность фибробластов в группе с раневым покрытием была в 1,4 раза значимо больше ($p = 0,035$), чем в группе без него и в 14 раз достоверно больше ($p = 0,012$) чем в интактной слизистой оболочке (см. таблицу). На основании ультрамикроскопического исследования можно отметить, что визуализировались преимущественно небольшие юные фибробласты с умеренно развитыми органеллами синтеза. Макрофагальная инфильтрация также была более выражена в группе с мембраной, численная плотность данной клеточной популяции в ней была в 2,3 и 10,7 раз достоверно больше, чем в группе с открытым раневым дефектом и группе контроля соответственно ($p = 0,034$, $p = 0,018$). На ультрамикроскопическом уровне макрофаги обладали признаками высокой фагоцитарной и синтетической активности, что отражалось на уровне экспрессии маркера CD68, которая значимо повышалась в 2,6 и 4,2 раз для группы без покрытия и группы с мембраной соответственно по сравнению со значениями в интактной слизистой оболочке ($p = 0,022$, $p = 0,031$). Более выраженная экспрессия маркера TGFβ1 наблюдалась в группе с открытым раневым дефектом: показатель H-score в ней был в 1,4 раза достоверно больше ($p = 0,045$), чем в группе с мембраной и в 6,3 раза достоверно больше, чем в интактной слизистой оболочке ($p = 0,022$) (см. таблицу) (рис. 1Б).

На 7-е сутки исследования в экспериментальных группах визуализировалась сформированная рыхлая

волокнистая соединительная ткань, между волокнами которой определялись скопления макрофагов и фибробластов (рис. 1В). На этом этапе регенерации раны во всех полях зрения преимущественно встречались макрофаги и фибробласты. Численная плотность первых была максимальной в группе без покрытия и достоверно превышала в 1,6 и 11,3 раз аналогичный показатель группы с полимерной мембраной и контрольной группы ($p = 0,019$, $p = 0,011$) (см. таблицу). Это соотносилось с экспрессией маркера CD68, для которого показатель H-score в группе без покрытия был в 1,2 и 6,5 раз значимо выше, чем в группе с покрытием и интактной слизистой оболочкой ($p = 0,048$, $p = 0,024$). При этом численная плотность фибробластов наоборот была максимальной в группе с мембраной и была достоверно выше в 1,35 раза таковой в группе без нее ($p = 0,041$) (см. таблицу). В группе без покрытия по-прежнему преобладали юные фибробласты, а в группе с использованием мембраны, в основном, визуализировались дифференцированные зрелые фибробласты с ультраструктурными признаками повышенной синтетической активности (рис. 1Г). Реакции на инородное тело в области имплантации мембраны не наблюдалось ни на одном из этапов эксперимента. Экспрессия маркера TGF β 1 была значимо выше в группе с открытым раневым дефектом в 2,8 раз по сравнению с группой с мембраной ($p = 0,036$) и в 8 раз по сравнению с группой контроля ($p = 0,013$).

На 12-е сутки исследования в группе без раневого покрытия встречались обширные очаги плотной волокнистой соединительной ткани (рис. 1Д). Ее удельная площадь была в 3,9 раз достоверно выше, чем в группе с покрытием ($p = 0,036$). Отражением этого процесса на макроскопическом уровне являлась деформация щечной области с убылью мягких тканей, на месте раневого дефекта определялся рубец протяженностью 4,5 мм (рис. 1Е). В группе с полимерной мембраной длина рубца достигала 1,5 мм, деформация мягких тканей была не выражена. В группе с мембраной численная плотность макрофагов и фибробластов достигала контрольных значений. В группе без раневого покрытия эти показатели были в 6 и в 7,2 раза достоверно выше интактных значений ($p = 0,032$, $p = 0,021$). В группе без раневого покрытия фибробласты сохраняли ультраструктурные признаки высокой синтетической активности, в то время как в группе с покрытием преобладали функционально неактивные фиброциты (рис. 1Ж). У макрофагов на ультраструктурном уровне визуализировались хорошо развитые гранулярный эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и митохондрии, что свидетельствовало о высокой синтетической активности. Экспрессия CD68 и TGF β 1 была значимо выше в группе с открытым раневым дефектом, чем в группе с покрытием и интактной слизистой оболочкой в 2 и 3 раза соответственно ($p = 0,019$, $p = 0,025$) (см. таблицу) (рис. 1З).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведения данного исследования были проанализированы основные предикторы развития фиброзной ткани в области раневого дефекта слизистой оболочки полости рта. На основании результатов исследования, а также анализа литературы можно сформировать следующую схему патоморфогенеза (рис. 2).

Согласно схеме, на первом этапе регенерации раневого дефекта, в фазу воспаления, наблюдалась

обширная клеточная инфильтрация в области заживления. В группе с использованием биосовместимой мембраны было выявлено значительное скопление макрофагов, чья численная плотность была значимо выше, чем в группе с открытым раневым дефектом. С этим показателем соотносилась увеличенная экспрессия маркера макрофагов CD68 в группе с полимерной мембраной. На ультрамикроскопическом уровне можно было отметить признаки усиленной синтетической активности макрофагов в группе с покрытием. Развитый синтетический аппарат был необходим для выделения биологически активных веществ, которые в том числе являлись аттрактантами для миграции фибробластов в зону ранения [11]. Полученные данные мы интерпретировали как факт перехода воспалительной стадии в пролиферативную, так как именно макрофаги отвечают за процесс направленной миграции фибробластов за счет высвобождения фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и TGF β , способствующих ангиогенезу, выработке коллагена и реэпитализации [12].

Также в группе с покрытием значимо увеличивалась численная плотность клеток фибробластического ряда. Это тоже свидетельствовало о том, что в группе с раневым покрытием основные процессы, происходящие в ране, переклюкались с воспалительной реакции на формирование соединительной ткани.

Однако для правильной интерпретации данных показателей необходим был их анализ в динамике, так как сохранение обширной инфильтрации, особенно макрофагами, на дальнейших этапах регенерации раны могло быть предпосылкой к развитию фиброза. Именно это мы и наблюдали в группе без раневого покрытия, где численная плотность макрофагов была значимо выше на 7-е сутки исследования, чем в группе с раневым покрытием, и не достигала контрольных значений на 12-е сутки исследования. Численная плотность фибробластов, наоборот, на 7-е сутки исследования была достоверно ниже в группе без покрытия. На 12-е сутки численная плотность фибробластов повышалась по сравнению с интактной слизистой оболочкой и группой с покрытием. Подобное взаимоотношение макрофагов и фибробластов в группе с открытой раной свидетельствовало о длительно текущем воспалительном процессе, который способствовал развитию фиброза в дальнейшем [11]. В группе с использованием биосовместимой пьезоэлектрической мембраны численная плотность рассматриваемых клеточных популяций восстанавливалась до контрольных значений на 12-е сутки исследования, что являлось положительным прогностическим признаком.

Выделение клетками TGF β 1 служит первоначальным триггером для начала регенерации раны, в связи с этим мы наблюдали увеличение его экспрессии на 3-и сутки исследования в обеих экспериментальных группах [12]. Однако его экспрессия была значимо больше в группе без раневого покрытия, чем в группе с биосовместимой мембраной, и достигала своего максимума на 7-е сутки исследования и не возвращалась к контрольным значениям на 12-е сутки исследования. Данный маркер выделяется рядом клеток в области раневого дефекта — тромбоцитами, макрофагами, фибробластами, кератиноцитами и др. [4]. И именно он имеет критически важную роль в ходе смены стадий регенерации, оказывая влияние на кооперацию макрофагов и фибробластов в области раны [5]. При этом отмечается, что не только разные типы клеток по-разному реагируют на TGF β 1, но и одни и те же клетки

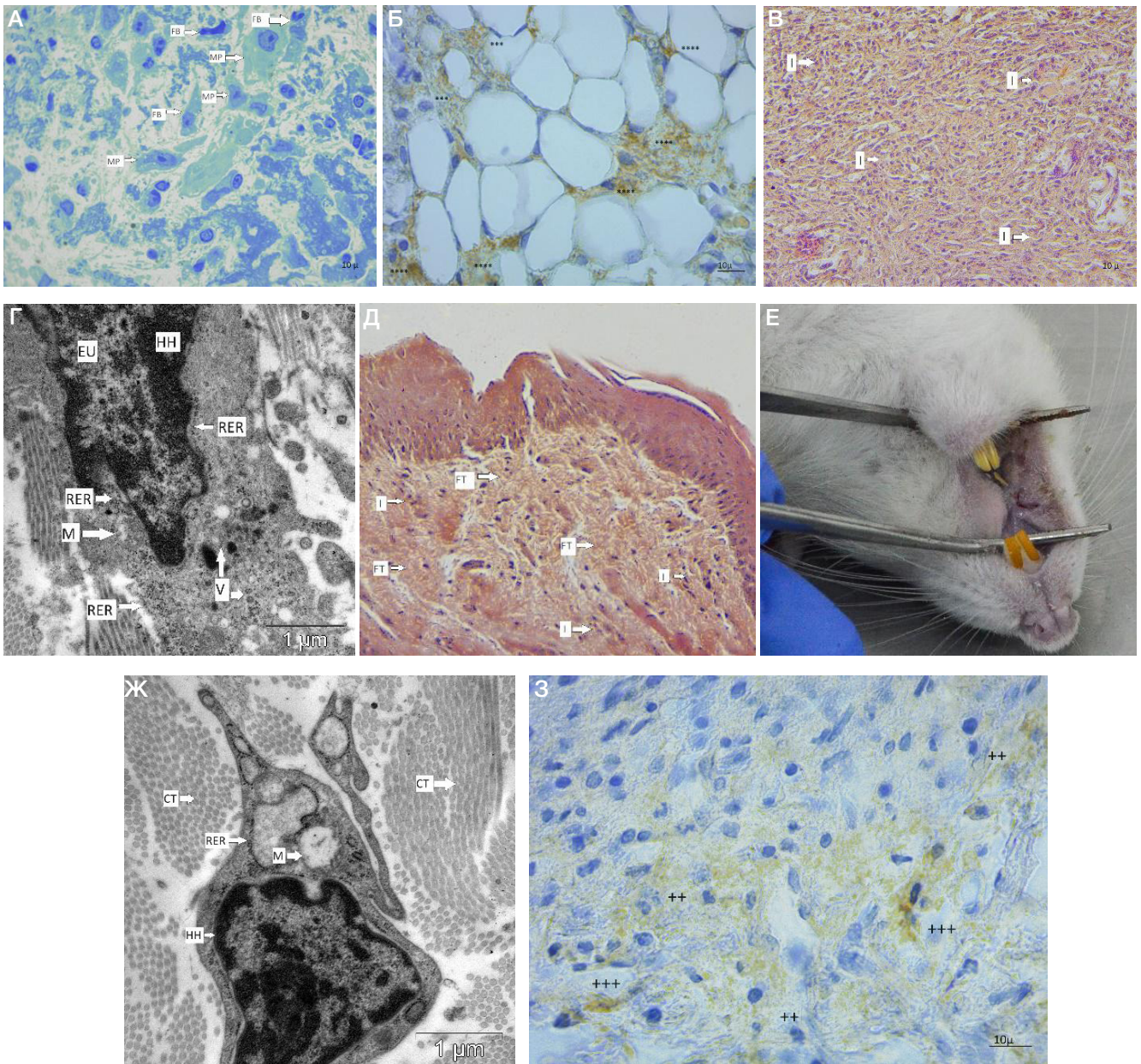


Рис. 1. Этапы регенерации раневого дефекта слизистой оболочки полости рта. **А.** Грануляционная ткань, включающая макрофаги и фибробласты, в области раневого дефекта (3-и сутки, 2-я группа; $\times 900$; окраска: толуидиновый синий). **Б.** Экспрессия TGF β 1 клетками грануляционной ткани в области раневого дефекта, докрашивание ядер гематоксилином (3-и сутки, 1-я группа; $\times 900$). **В.** Рыхлая волокнистая соединительная ткань в области раневого дефекта с обширной клеточной инфильтрацией (7-е сутки, 1-я группа; окраска: гематоксилин, эозин; $\times 400$). **Г.** Дифференцированный фибробласт (7-е сутки, 2-я группа; ТЭМ, $\times 5000$). **Д.** Плотная волокнистая соединительная ткань с клеточной инфильтрацией (12-е сутки, 1-я группа; окраска: гематоксилин, эозин; — 400). **Е.** Макроскопическая картина после регенерации раневого дефекта. Убыль мягких тканей. Рубец длиной 4,5 мм. **Ж.** Синтетически не активный фиброцит (12-е сутки, 2-я группа; ТЭМ, $\times 5000$). **З.** Экспрессия CD68 клетками соединительной ткани, докрашивание ядер гематоксилином (12-е сутки, 2-я группа; $\times 400$). FT — плотная волокнистая соединительная ткань, I — клеточная инфильтрация, EU — эухроматин, HH — гетерохроматин, RER — гранулярный эндоплазматический ретикулум, M — митохондрия, V — везикулы, MP — макрофаг, FB — фибробласт; ++++ — очень сильное окрашивание; +++ — сильное окрашивание; ++ — умеренное окрашивание; + — слабое окрашивание; — — нет окрашивания

могут проявлять противоположные ответы в зависимости от экспериментальных условий [5].

Зафиксированное на 7-е сутки исследования повышение экспрессии TGF β 1 опосредовало сохранение обширной инфильтрации в области раны синтетически активными фибробластами и макрофагами на 12-е сутки исследования в группе с открытым раневым дефектом. В то время как их численная плотность в группе с покрытием возвращалась к контрольным значениям на финальном этапе регенерации раны на фоне более низких значений H-score для TGF β 1. К тому же клетки фибробластического ряда были представлены в основном синтетически неактивными фиброцитами, что свидетельствовало о

завершении процесса формирования соединительной ткани в области раневого дефекта в группе с полимерной мембраной. В группе с открытым раневым дефектом на 12-е сутки исследования в области раны присутствовали, в основном, синтетически активные фибробласты. Под действием TGF β 1 фибробласты подвергались пролиферации, миграции и дифференцировке, а на фоне aberrантной передачи сигнала от TGF β 1 активировался механизм образования рубцовой ткани [12]. Формирование рубцовой ткани было связано с патологическим и дезорганизованным процессом заживления раны при хроническом воспалении [13], которое возникало на фоне повышения уровня экспрессии TGF β 1, что являлось

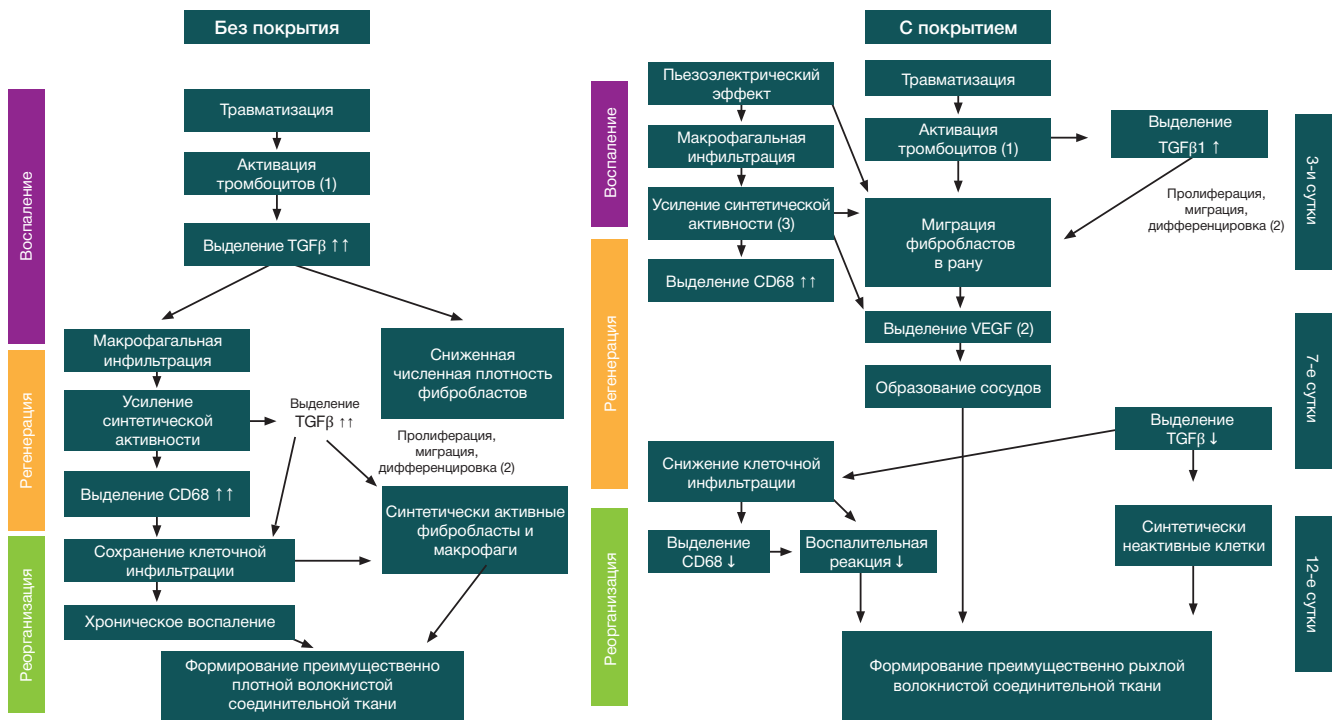


Рис. 2. Схема патоморфогенеза регенерации раневого дефекта слизистой оболочки полости рта при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны и без нее. ↑ — невыраженное усиление экспрессии; ↑↑ — умеренное усиление экспрессии; ↑↑↑ — выраженное усиление экспрессии; ↓ — снижение экспрессии. 1 — по данным Morikawa M, Derynck R, et al. [5]; 2 — по данным Xu X, Gu SY, et al. [11]; 3 — по данным Zhang T, Wang XF, et al. [12]

важным этапом патогенеза хронических ран [14]. Таким образом, повышение экспрессии TGFβ1 можно считать важным профиброзным маркером [15].

Поэтому в группе с открытым раневым дефектом в ходе взаимодействия между фибробластами и макрофагами под воздействием TGFβ1 формировалась плотная волокнистая соединительная ткань, которая была основой фиброзных изменений, что на макроскопическом уровне проявлялось наличием рубца длиной 4,5 мм и убылью мягких тканей.

Полимерные пьезоэлектрические мембраны из сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом, изготовленные при помощи электроспиннинга, являются новейшей разработкой лаборатории гибридных биоматериалов НИ ТПУ. Ранее в мировой практике не проводились исследования относительно эффективности использования аналогов, схожих по физико-химическим свойствам, для регенерации раневых дефектов слизистой оболочки полости рта. На основании этой работы мы предполагаем, что пьезоэлектрические свойства биосовместимых полимерных мембран способствовали снижению экспрессии TGFβ1, что приводило к ингибированию его влияния на активность фибробластов и макрофагов. Благодаря этому происходило формирование рыхлой волокнистой соединительной ткани, в то время

как в группе с открытой раной происходило образование плотной волокнистой ткани и, как следствие, рубцевание. Подтверждением данного предположения являются данные, полученные при сравнительном исследовании пьезоэлектрических и диэлектрических покрытий при регенерации ран слизистой оболочки полости рта, в ходе которого была зафиксирована меньшая удельная площадь рубцовой ткани в группе с пьезоэлектрическим покрытием [7].

ВЫВОДЫ

В проведенном исследовании выявлено положительное влияние биосовместимых пьезоэлектрических мембран на предупреждение развития фиброза в процессе регенерации ран, что было подтверждено анализом взаимодействия клеток макрофагального и фибробластического ряда и экспрессии прогностических маркеров CD68 и TGFβ 1. Использование полимерных биосовместимых мембран в стоматологической практике поможет в перспективе снизить риск возникновения постоперационных осложнений в виде рубцовой деформации мягких тканей ротовой полости. В перспективе планируется дальнейшее изучение влияния покровных мембран на регенерацию слизистой оболочки полости рта для усовершенствования их свойств.

Литература

1. Nikoloudaki G, Creber K, Hamilton DW. Wound healing and fibrosis: a contrasting role for periostin in skin and the oral mucosa. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020; 318 (6): C1065-C1077. DOI: 10.1152/ajpcell.00035.2020.
2. Griffin MF, Fahy EJ, King M, Guardino N, Chen K, Abbas DB, et al. Understanding scarring in the oral mucosa. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2022; 11 (10): 537–547. DOI: 10.1089/wound.2021.0038.
3. Smigiel KS, Parks WC. Macrophages, wound healing, and fibrosis: recent insights. *Curr Rheumatol Rep.* 2018; 20 (4): 17. DOI: 10.1007/s11926-018-0725-5.
4. Kim YJ, Carvalho FC, Souza JA, Gonçalves PC, Nogueira AV, Spolidório LC, et al. Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF-β and VEGF production. *Wound Repair Regen.* 2013; 21 (3):

- 456–63. DOI: 10.1111/wrr.12041.
5. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016; 8 (5): a021873. DOI: 10.1101/cshperspect.a021873. PMID: 27141051; PMCID: PMC4852809.
 6. Kuninaka Y, Ishida Y, Ishigami A, Nosaka M, Matsuki J, Yasuda H, et al. Macrophage polarity and wound age determination. *Sci Rep.* 2022; 12 (1): 20327. DOI: 10.1038/s41598-022-24577-9.
 7. Chernova UV, Varakuta EY, Koniaeva AD, Leyman AE, Sagdullaeva SA, Plotnikov E, et al. Piezoelectric and dielectric electrospun fluoropolymer membranes for oral mucosa regeneration: a comparative study. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2024. DOI: 10.1021/acsami.4c01867.
 8. Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментальных биологических клиник (vivariumов)»: постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 29.09.2014 № 51 [Электронный ресурс]. Справочно-правовая система «Консультант Плюс».
 9. Clause BT. The Wistar Rat as a right choice: establishing mammalian standards and the ideal of a standardized mammal. *J Hist Biol.* 1993; 26 (2): 329–49. DOI: 10.1007/BF01061973.
 10. McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med.* 1985; 109 (8): 716–21. PMID: 3893381.
 11. Xu X, Gu S, Huang X, Ren J, Gu Y, Wei C, et al. The role of macrophages in the formation of hypertrophic scars and keloids. *Burn Trauma.* 2020; 8: tkaa006. DOI: 10.1093/burnst/tkaa006.
 12. Zhang T, Wang XF, Wang ZC, Lou D, Fang QQ, Hu YY, et al. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF- β /Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation. *Biomed Pharmacother.* 2020; 129: 110287. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110287.
 13. Shi A, Li J, Qiu X, Sabbah M, Boroumand S, Huang TC, et al. TGF- β loaded exosome enhances ischemic wound healing in vitro and in vivo. *Theranostics.* 2021; 11 (13): 6616–31. DOI: 10.7150/thno.57701.
 14. Liarte S, Bernabé-García Á, Nicolás FJ. Role of TGF- β in skin chronic wounds: a keratinocyte perspective. *Cells.* 2020; 9 (2): 306. DOI: 10.3390/cells9020306.
 15. Eslami A, Gallant-Behm CL, Hart DA, Wiebe C, Honardoust D, Gardner H, et al. Expression of integrin alphavbeta6 and TGF β in scarless vs scar-forming wound healing. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57 (6): 543–57. DOI: 10.1369/jhc.2009.952572.

References

1. Nikoloudaki G, Creber K, Hamilton DW. Wound healing and fibrosis: a contrasting role for periostin in skin and the oral mucosa. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020; 318 (6): C1065–C1077. DOI: 10.1152/ajpcell.00035.2020.
2. Griffin MF, Fahy EJ, King M, Guardino N, Chen K, Abbas DB, et al. Understanding scarring in the oral mucosa. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2022; 11 (10): 537–547. DOI: 10.1089/wound.2021.0038.
3. Smigiel KS, Parks WC. Macrophages, wound healing, and fibrosis: recent insights. *Curr Rheumatol Rep.* 2018; 20 (4): 17. DOI: 10.1007/s11926-018-0725-5.
4. Kim YJ, Carvalho FC, Souza JA, Gonçalves PC, Nogueira AV, Spolidório LC, et al. Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF- β and VEGF production. *Wound Repair Regen.* 2013; 21 (3): 456–63. DOI: 10.1111/wrr.12041.
5. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016; 8 (5): a021873. DOI: 10.1101/cshperspect.a021873. PMID: 27141051; PMCID: PMC4852809.
6. Kuninaka Y, Ishida Y, Ishigami A, Nosaka M, Matsuki J, Yasuda H, et al. Macrophage polarity and wound age determination. *Sci Rep.* 2022; 12 (1): 20327. DOI: 10.1038/s41598-022-24577-9.
7. Chernova UV, Varakuta EY, Koniaeva AD, Leyman AE, Sagdullaeva SA, Plotnikov E, et al. Piezoelectric and dielectric electrospun fluoropolymer membranes for oral mucosa regeneration: a comparative study. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2024. DOI: 10.1021/acsami.4c01867.
8. Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментальных биологических клиник (vivariumов)»: постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 29.09.2014 № 51 [Электронный ресурс]. Справочно-правовая система «Консультант Плюс».
9. Clause BT. The Wistar Rat as a right choice: establishing mammalian standards and the ideal of a standardized mammal. *J Hist Biol.* 1993; 26 (2): 329–49. DOI: 10.1007/BF01061973.
10. McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med.* 1985; 109 (8): 716–21. PMID: 3893381.
11. Xu X, Gu S, Huang X, Ren J, Gu Y, Wei C, et al. The role of macrophages in the formation of hypertrophic scars and keloids. *Burn Trauma.* 2020; 8: tkaa006. DOI: 10.1093/burnst/tkaa006.
12. Zhang T, Wang XF, Wang ZC, Lou D, Fang QQ, Hu YY, et al. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF- β /Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation. *Biomed Pharmacother.* 2020; 129: 110287. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110287.
13. Shi A, Li J, Qiu X, Sabbah M, Boroumand S, Huang TC, et al. TGF- β loaded exosome enhances ischemic wound healing in vitro and in vivo. *Theranostics.* 2021; 11 (13): 6616–31. DOI: 10.7150/thno.57701.
14. Liarte S, Bernabé-García Á, Nicolás FJ. Role of TGF- β in skin chronic wounds: a keratinocyte perspective. *Cells.* 2020; 9 (2): 306. DOI: 10.3390/cells9020306.
15. Eslami A, Gallant-Behm CL, Hart DA, Wiebe C, Honardoust D, Gardner H, et al. Expression of integrin alphavbeta6 and TGF β in scarless vs scar-forming wound healing. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57 (6): 543–57. DOI: 10.1369/jhc.2009.952572.