

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

«УТВЕРЖДАЮ»

**Министерство здравоохранения
Председатель научно-
технического совета**

_____ **Ш.К.Атаджанов**

«_____» _____ 2026 г.

**ХРАМОВА НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА
ХУСАНОВА ЮЛДУЗ БАХОДИРОВНА
ЧАРЫШНИКОВА ОКСАНА СТАНИСЛАВОВНА
ЦИФЕРОВА НАРГИЗА АЛЕКСАНДРОВНА**

**КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ В ПРОТОКОЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФЕКТОВ МЯГКИХ
ТКАНЕЙ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ**

Ташкент - 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. НОВЕЙШИЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФЕКТОВ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА	16
§1.1. Современное состояние проблемы замещения дефектов слизистой оболочки полости рта	16
§1.2. Использование клеточных продуктов в медицине	19
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	22
§2.1. Материал исследования	22
§2.2. Клеточные линии	22
§2.3. Оценка биосовместимости применяемых подложек	26
§2.4. Клеточные методы исследования	26
§2.5. Гематологические и биохимические методы исследования	28
§2.6. Гистоморфологические исследования органов тканей и экспериментальных животных	31
§2.7. Моделирование экспериментального дефекта слизистой оболочки полости рта	34
§2.8. Методы статистической обработки	35
ГЛАВА III. РАЗРАБОТКА И ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ	37

§3.1. Создание тканеинженерной конструкции для оптимизации заживления дефектов слизистой полости рта в эксперименте	37
§3.2. Оценка субхронической токсичности по состоянию внутренних органов экспериментальных животных	42
§3.3. Результаты доклинических исследований на белых крысах	52
ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	62
§4.1. Оценка эффективности клеточной терапии аутофибробластами при дефектах полости рта	62
§4.2. Влияние тканеинженерной конструкции на морфологию дефекта слизистой оболочки	67
§4.3. Разработка алгоритма лечения пациентов с дефектами слизистой полости рта путём применения методов тканевой инженерии и клеточной терапии	71
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	74
ВЫВОДЫ	78
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	79
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	80
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	82

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания полости рта в совокупности занимают 13-е место среди наиболее распространённых видов рака в мире. Согласно последним оценкам, с травмой полости рта сталкивается 1 млрд человек. Также, согласно последним оценкам, ежегодно происходит 140 000 новых случаев заболеваний гангреной полости рта и лица (нома).

Полноценная реабилитация данных категорий пациентов, обусловлена не всегда полноценной регенерацией тканей, таким образом это обуславливает необходимость использования методов регенеративной медицины, включая применение клеточной терапии [3, с.190;12, с.15;62, с.34;85;91, р.366;102, р.643]. Клеточная терапия предполагает использование инновационных биомедицинских подходов, при которых клетки *in vitro* вводятся пациенту для лечения ряда патологических состояний путём замены больных или дисфункциональных клеток здоровыми функционирующими [1;13;43, с.7;70, с.114;88;109, р.137;98;123, р.99].

Являясь основными клетками соединительнотканного слоя кожи, ФБ синтезируют факторы роста, ферменты и цитокины, стимулирующие рост коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон, участвуют в метаболизме межклеточного вещества, обновлении основных компонентов внеклеточного матрикса и обеспечивают гомеостаз и физиологическую морфофункциональную организацию кожи, а также запускают процессы репаративного гистогенеза [4;29, с.59;48, с.8;72, с.167;104, р.245, 116, р.846].

Регенеративный потенциал фибробластов обусловлен их высокой пластичностью и мультипотентностью, сохранением диплоидного кариотипа клеток в культуре, низкой экспрессией антигенов гистосовместимости и не онкогенностью [83, р.15;92, р.1611;119, р.1165].

ограниченной продолжительностью жизни при трансплантации клеток *in vitro* и доступности биоматериала для их выделения [72, с.167;94, р.194;106;114, р.143].

В мире целью изучения методов лечения больных с дефектами полости рта ведутся многочисленные научные исследования. На сегодняшний день это в основном различные хирургические методы лечения: закрытие дефектов с помощью традиционных способов (свободная пересадка тканей, местное перемещение тканей и т. д.). В большинстве случаев не позволяют достичь результатов, предъявляемых к замещению дефектов полости рта в соответствии с современными требованиями. Применяемые сегодня методы устранения дефектов слизистой полости рта имеют определённые недостатки [5;14, с.235;20, с.78;30, с.22;107;120]. Таким образом, поиск альтернативных методов устранения дефектов слизистой полости рта является актуальной и требует решения путём привлечения высокотехнологичных методов регенеративной медицины и тканевой инженерии [64; с.82, с.29-40;88, с.1441;118].

Поиск альтернативных методов устранения дефектов слизистой полости рта является актуальной и требует привлечения высокотехнологичных методов регенеративной медицины и тканевой инженерии [50, с.94;53, с.12;79, с.407,169, с.380;179, с.91;189, с.437-448].

В мире предложено множество способов из различных видов клеток и носителей. Данное направление регенеративной медицины является наиболее коммерциализированным и пользуется спросом в практической медицине [75, с.1-10;77, с.58-59;83, с.187-205].

В нашей стране на сегодняшний день для развития регенеративной медицины также принимаются меры. В этой связи ставятся задачи «...повышения эффективности, качества и доступности медицинской помощи населению, а также создание системы медицинской стандартизации, внедрение высокотехнологических методов диагностики и лечения, а также пропаганда здорового образа жизни и профилактики заболеваний...». В данных задачах

особое место выделяется для развития современных методов регенеративной медицины с целью улучшения качества проводимых методов хирургического лечения дефектов мягких тканей полости рта[49,с.24;84;86;93]. Данное диссертационное исследование в определённой степени служит выполнению задач, утверждённых Указами Президента Республики Узбекистан Данное диссертационное исследование в определённой степени служит выполнению задач, утверждённых Указами Президента Республики Узбекистан от 6 июля 2022 года «Об организационных мерах по реализации стратегии инновационного развития Республики Узбекистан на 2022–2026 годы», №ПП – 4899 от 25 ноября 2020 года «О комплексных мерах по развитию биотехнологий и совершенствовании системы обеспечения биобезопасности страны», №УП – 5590 «О комплексных мерах по коренному совершенствованию системы здравоохранения Республики Узбекистан» от 7 декабря 2018 года, также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Научные исследования, направленные на совершенствование методов лечения дефектов слизистой полости рта с привлечением методов регенеративной медицины и тканевой инженерии проводятся в ведущих мировых научных центрах и в высших учебных заведениях, в частности: Stanford University, University of Guelph (Канада); University of Alberta (Канада); University of Kent (Великобритания), University of Illinois at Chicago (США); Johns Hopkins University (США); Florida International University (США); Oregon State University (США); Northeastern University (США); University of Chemistry and Technology Prague (Чехия); ETH Zurich – Swiss Federal Institute of Technology (Швейцария); Rhine-Waal University of Applied Sciences (Германия); Institute of Technology, Sligo (Ирландия); National University of Ireland, Galway (Ирландия); KU Leuven University (Бельгия); Peking University (Китай); National University of Singapore (Сингапур); TAFE SA (Австралия); Flinders University (Австралия); University of Auckland (Новая Зеландия); Ташкентский государственный

медицинский университет (Узбекистан).

В настоящее время имеется ряд научных открытий в области регенеративной медицины ран различного генеза: изучена возможность использования клеточных культур фибробластов при регенерации ран и восстановлении слизистой (Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Российская Федерация); разработаны инъекционные формы тканеинженерных конструкций (Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова, Российская Федерация); исследованы вопросы миграции фибробластов десны на материалы, покрытые магнием (Центр университетской медицины «Шарите», Германия); доказано положительное влияние гидрогеля из нанофибриллярной целлюлозы на мезенхимальные стволовые клетки человека (Университет Рединга, Великобритания); поучены и внедрены в клиническую практику тканеинженерные конструкции на основе клеток соединительной ткани (Ташкентский государственный медицинский институт, Центр Передовых технологий Узбекистан).

В мире по оптимизации заживления дефектов различного генеза клеточными технологиями ведутся работы сразу в нескольких направлениях: стимулирование регенерации путём создания тканеинженерных конструкций на основе различных подложек с заданными свойствами и клеточных элементов, которые уже вошли в клиническую и фармакологическую практику многих стран [63,с.15;82;99,р.305;113,р.572]. На данный момент тканеинженерные конструкции на основе ауто и аллофибробластов являются наиболее востребованными [8,с.65;11,с.99;58;69].

«Применение дермальных фибробластов является перспективным методом для лечения как дефектов кожи, так и слизистой полости рта. Данные клетки легко культивируются в лабораторных условиях, не теряя своих функций. Благодаря ключевой роли в поддержании гомеостаза ткани, фибробласты, как

никакие другие клетки, способны эффективно создавать условия для пролиферации и миграции других типов клеток (Зорина А., Зорин В., Черкасов В., 2013). Полученные на сегодняшний день данные достоверно демонстрируют высокую клиническую эффективность и безопасность применения фибробластов для коррекции косметических дефектов и лечения» (Квицинская Н.А., 2011, Храмова Н.В., Амануллаев Р.А., 2021) [66, с.20; 70, с.145].

В Республике Узбекистан также работали над новыми методами регенеративной медицины путём использования клеточной терапии. Салахиддинов К. З. (2010) доказал обоснованность предварительной очистки раны и нанесения на раневую поверхность фибробластов. В Институте химии и растительных веществ Цеомашко Н.Е. и Азимова Ш.С., выделяли коллаген и использовали для создания дермальных эквивалентов кожи для заместительной терапии (2012).

Проблема лечения пациентов с дефектами слизистой полости рта остаётся актуальной из-за ряда проблем таких как недостаточность мягких тканей при проведении местнопластических операций, наличие дополнительных рубцов, невыраженный функциональный эффект после оперативного вмешательства.

Диссертационное исследование посвящено совершенствованию методов хирургического лечения пациентов с дефектами мягких тканей полости рта тканеинженерными конструкциями на основе нерезорбируемой подложки из шелковой отваренной марли и дермальных фибробластов. Это определяет актуальность исследования ведущим направлениям научно-исследовательских работ РУз.

Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ Ташкентского государственного стоматологического институт за №01190023 «Разработка современных подходов к диагностике, лечению и реабилитации больных с дефектами, деформациями, воспалительными заболеваниями и травмами, опухолями челюстно-лицевой

области с учётом воздействия факторов среды обитания» (2020-2025 гг.)

Цель исследования: экспериментально-клиническое обоснование применения клеточной терапии на основе клеток соединительной ткани при дефектах полости рта.

Задачи исследования:

разработать оптимальную методику выделения первичных дермальных фибробластов человека методами дезагрегации и пассажа лоскута для на основе жизнеспособных дермальных фибробластов;

провести экспериментальные имплантации клеточно-инженерных конструкций из клеток соединительной ткани у лабораторных животных для сравнительной оценки тканевой реакции и токсического влияния на организм;

оценить возможность применения тканеинженерной конструкции на основе шелковой отваренной марли и клеток соединительной ткани в сочетании с инъекционным введением фибробластов при дефектах полости рта у лабораторных животных;

разработать показания и стандартный протокол применения клеточных технологий на основе клеток соединительной ткани при дефектах полости рта.

Объектом исследования явились 30 беспородных половозрелых крыс-самцов, а также 12 пациентов, находившихся на амбулаторном и стационарном лечении в поликлинике хирургической стоматологии и клинике взрослой челюстно-лицевой хирургии с дефектами и деформациями челюстно-лицевой области, в возрасте от 35 года до 67 лет за период 2023-2025 гг.

Предметом исследования явились результаты морфологических исследований слизистой полости рта, внутренних органов экспериментальных животных, сыворотка крови, а также цитологический анализ состояния слизистой полости рта пациентов с дефектами полости рта.

Методы исследования. Нами использованы экспериментальные, гематологические, биохимические, гистологические, клинические, математико-

статистические методы.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

доказано, что комбинирование методов дезагрегации и пассажа лоскута позволяет получить срочное количество жизнеспособных клеток в течение двух недель и поддерживать культуру дермальных фибробластов в течение длительного времени;

установлено, что применение шелковой отваренной марли с аллофибробластами с дополнительным обкалыванием аллофибробластами не повышает уровень ферментов АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, а содержание гамма-глутамилтранспептидазы, общего белка, альбумина, холестерина, глюкозы, общего билирубина не выходят за рамки физиологической нормы, это подтверждает отсутствие токсического влияния на организм при лечении дефектов полости рта у лабораторных животных;

установлено, что при применении шелковой отваренной марли с аллофибробластами с дополнительным обкалыванием аллофибробластами из-за обилия образования капилляров и грануляционной ткани оптимизируется скорость заживления слизистой полости рта у лабораторных животных составила 87% на пятые сутки;

доказано, что применение клеточных технологий на основе клеток соединительной ткани при хирургическом лечении дефектов слизистой полости рта стимулирует образование сосудов, улучшает качество новообразованной слизистой оболочки и предотвращает формирование образования грубой соединительной ткани.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

доказано, что предложенный метод лечения дефектов полости рта путём применения шелковой отваренной марли с аутофибробластами и обкалывание аутофибробластами не оказывает токсического влияния на организм и оптимизирует заживление слизистой полости рта у лабораторных животных, что

позволяет рекомендовать метод к клиническому применению;

доказано, что применение клеточных технологий на основе клеток соединительной ткани при подготовке к хирургическому лечению способствует полноценной регенерации слизистой оболочки, что позволяет рекомендовать его в качестве дополнительной терапии для улучшения качества лечения;

установлено, что разработанная отечественная тканеинженерная конструкция на основе жизнеспособных аутологичных фибробластов в биосовместимом носителе предполагает наличие наибольшего терапевтического эффекта для пациентов с дефектами полости рта, получающих безопасную клеточную терапию собственными клетками.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость выполненной работы заключается в том, комбинация методов дезагрегации и пассажа лоскута оптимизирует процесс культивирования дермальных фибробластов и позволяет получить необходимое количество клеток и сохранять культуру продолжительное время.

Применение шелковой отваренной марли с аллофибробластами с дополнительным обкалыванием аллофибробластами не оказывает токсического влияния на организм лабораторных животных и улучшает заживление дефектов слизистой полости рта.

Практическая значимость заключается в том, что предложенная схема применения инъекций аутофибробластов в сочетании с шелковой отваренной марле с аутофибробластами для оптимизации состояния тканей операционного поля позволит улучшить функциональные результаты лечения, при этом одновременно решается ряд серьёзных вопросов: существенное сокращение тяжести переносимых операций и обусловленное этим снижение послеоперационных осложнений.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных результатов по оптимизации заживления дефектов слизистой полости рта

тканеинженерными конструкциями (заключение Научно-технического совета Министерства здравоохранения РУз №12/50 от 15 февраля 2025 года):

первая научная новизна: определено, что комбинирование методов дезагрегации и пассажа лоскута позволяет получить срочное количество жизнеспособных клеток в течение двух недель и поддерживать культуру дермальных фибробластов в течение длительного времени; внедрение научной новизны в практику: в отделении Взрослой челюстно-лицевой хирургии клиники Ташкентского государственного стоматологического института, отделения экстренной челюстно-лицевой хирургии Клинической больницы скорой медицинской помощи г. Ташкента, в платном отделении детской стоматологической поликлиники №4 г. Ташкента (заключение Министерства здравоохранения №04-п/144 от 3 апреля 2024 года). Социальная эффективность научной новизны: автоматический подсчёт клеток, позволяет оптимизировать процесс культивирования, снижает трудозатраты. Экономическая эффективность научной новизны: позволяет уменьшить рабочее время клеточных специалистов, а также улучшить качество культивируемого материала, что восполняет 100% потребности при выращивании клеток в лабораторных условиях.

вторая научная новизна: установлено, применение шелковой отваренной марли с аллофибробластами с дополнительным обкалыванием аллофибробластами не повышает уровень ферментов АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, а содержание гамма-глутамилтранспептидазы, общего белка, альбумина, холестерина, глюкозы, общего билирубина не выходят за рамки физиологической нормы, что подтверждает отсутствие токсического влияния на организм при лечении дефектов полости рта у лабораторных животных; внедрение научной новизны в практику: в отделении Взрослой челюстно-лицевой хирургии клиники Ташкентского государственного стоматологического института, отделения экстренной челюстно-лицевой хирургии Клинической

больницы скорой медицинской помощи г. Ташкента, в платном отделении детской стоматологической поликлиники №4 г. Ташкента (заключение Министерства здравоохранения №04-п/143 от 3 апреля 2024 года). Социальная эффективность научной новизны: применение шелковой отваренной марли с аллофибробластами с дополнительным обкалыванием аллофибробластами не оказывает токсического влияния на организм лабораторных животных, что позволяет рекомендовать его к клиническому применению. Экономическая эффективность научной новизны: восполняет на 50% потребность в новых высокотехнологичных методах лечения дефектов слизистой полости рта.

третья научная новизна: установлено, при применении шелковой отваренной марли с аллофибробластами с дополнительным обкалыванием аллофибробластами из-за обилия образования капилляров и грануляционной ткани оптимизируется скорость заживления слизистой полости рта у лабораторных животных составила 87% на пятые сутки; внедрение научной новизны в практику: в отделении Взрослой челюстно-лицевой хирургии клиники Ташкентского государственного стоматологического института, отделения экстренной челюстно-лицевой хирургии Клинической больницы скорой медицинской помощи г. Ташкента, в платном отделении детской стоматологической поликлиники №4 г. Ташкента (заключение Министерства здравоохранения №04-п/143 от 3 апреля 2024 года). Социальная эффективность научной новизны: при применении шелковой отваренной марли с аллофибробластами с дополнительным обкалыванием аллофибробластами способствует полноценной регенерации слизистой полости рта, что можно рекомендовать его в качестве до и после операционного лечения дефектов слизистой полости рта для оптимизации заживления. Экономическая эффективность научной новизны: улучшает заживление послеоперационной раны при дефектах полости рта, что на 50% улучшает результаты лечения данной группы пациентов.

четвёртая научная новизна: доказано, что применение клеточных технологий на основе клеток соединительной ткани при хирургическом лечении дефектов слизистой полости рта стимулирует образование сосудов, улучшает качество новообразованной слизистой оболочки и предотвращает формирование образования грубой соединительной ткани; внедрение научной новизны в практику: в отделении Взрослой челюстно-лицевой хирургии клиники Ташкентского государственного стоматологического института, отделения экстренной челюстно-лицевой хирургии Клинической больницы скорой медицинской помощи г. Ташкента, в платном отделении детской стоматологической поликлиники №4 г. Ташкента (заключение Министерства здравоохранения №04-п/143 от 3 апреля 2024 года). Социальная эффективность научной новизны: Социальная эффективность научной новизны: научные исследования показали, что клеточные технологии является дополнительной терапией для оптимизации заживления при лечении пациентов с дефектами слизистой полости рта. Для улучшения результатов лечения рекомендуется применение их для подготовки тканей перед оперативным вмешательством, а при необходимости использование во время и после хирургического вмешательства. Экономическая эффективность научной новизны: потребность в новых клеточных технологиях растёт, на данный время предложенные клеточные технологии на основе клеток соединительной ткани дешевле зарубежных аналогов в три раза, также отсутствуют расходы на транспортировку, что покрывает на 100 % потребность в клеточной терапии в Республике Узбекистан.

ГЛАВА I. НОВЕЙШИЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФЕКТОВ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

1.1. Современное состояние проблемы замещения дефектов слизистой оболочки полости рта

Актуальность оказания помощи пациентам с дефектами слизистой полости рта связана со многими факторами, такими как обильное кровоснабжение и иннервация, психологические проблемы, связанные с нарушением внешнего вида, все это затрудняет оказание помощи данной категории пациентов [57;101, р.514;103]. По-прежнему высок рост числа пациентов с дефектами и деформациями челюстно-лицевой области, что связано как с техногенными факторами (войны, автоаварии и т.п.), так и ростом числа онкологических заболеваний. Операции при наличии злокачественной опухоли в полости рта травматичны и приводят к развитию стойких функциональных нарушений [6, с.24;16, с.23;18, с.6;22, с.18;23, с.190;31, с.8;37, с.14].

Имеющиеся на сегодняшний день хирургические способы устранения дефектов слизистой полости рта не всегда приносят желаемый эстетический и функциональный результат, прежде всего снижают качество жизни пациентов [65,с.78;112,121,р.303]. Также операции по устранению дефектов слизистой полости рта являются технически сложными, имеются ограничения по объёму используемого материала, заимствованный с других частей тела материал (свободная пересадка тканей) отличается по цвету, консистенции, во многих случаях происходит лишь достижение функционального результата [40,с.15;81,с.285;87]. Современные методы микрохирургии позволяют получить достаточно хороший эффект, но здесь имеются также некоторые проблемы: отсутствие специалистов, требуется специальное оснащение и инструменты, также нередки случаи послеоперационных осложнений в виде тромбообразования [10,с.143;19,с.104;24,с.68;38,с.98;47;50,с.21;56;60,с.68].

Согласно исследованиям Мелешиной А.В., Быстровой А.С., Роговой О.С., Воротелякф Е.А., Васильева А.В., Загайновой Е.В., 2017 «Большинство тканеинженерных заменителей живой кожи создают путём культивирования клеток кожи в лабораторных условиях и комбинирования их с подложкой. Эквиваленты кожи используют для восстановления структуры и, следовательно, барьерной функции кожи при лечении ожоговых больных, а также для инициирования заживления ран, например, при хронических незаживающих язвах [41, с.198;51, с.19;54, с.107]. Применение тканеинженерных конструкций (ТИК) (biomaterial based tissue regeneration) оптимизирует заживление ран, уменьшает воспаление и боль, а также предотвращает образование рубцов, контрактуры или пигментации» [2, с.37;7, с.23;33, с.201;52, с.79]. В большинстве научных работ для тканеинженерных конструкций используют фибробласты и кератиноциты, так как в коже млекопитающих они преобладают. Также для восстановления кожи часто используют коллаген вследствие высокого содержания его в внеклеточном матриксе кожи [9, с.13;17, с.392;42;55, с.238;68, с.95;73, с.57;96, р.255].

Власов А.А. (2010) экспериментально обосновал применение раневых покрытий на основе коллагена и хитозана и клеточных технологий «Каллаит-Бол» для лечения термических ожогов. Это биodeградируемое раневое покрытие обладает низкой цитотоксичностью и состоит из модифицированных гликозаминогликанами коллаген-хитозановых покрытий с трансплантированными эмбриональными аллогенными фибробластами. Биополимерное покрытие в комбинации с гликозаминогликанами и сывороточным фактором роста «адгелон» контролирует количество грануляций, тем самым оптимизируя заживление ожогов [8, с.13].

«Существует два основных подхода к созданию тканеинженерных конструкций. Первый связан с использованием специального устройства -

биореактора, обеспечивающего условия для дифференциации и пролиферации клеток с последующим формированием тканевых структур. Вторым путем заключается в использовании в качестве биореактора организма реципиента и при возможности формирование тканеинженерных конструкций *in situ*» (Севастьянов В.И., 2014). Заключительный этап — это внедрение тканеинженерной конструкции в область поражённого органа или предварительное размещение в область, хорошо снабжаемой кровью, для формирования микроциркуляции внутри ТИК [34,с.210;46,с.48;105, р.230;111, р.394].

«Также плёнки, изготовленные из смеси фиброина с хитозаном, хорошо поддерживают адгезию и пролиферацию фибробластов, обеспечивают межклеточные взаимодействия. В адгезировавших клетках наблюдали экспрессию - актина, а также секрецию коллагена I типа, присутствие которого в межклеточном матриксе характерно для дермы кожи» (Сафонова Л.А., Боброва М.М., Агапова О.И., Архипова А.Ю., Гончаренко А.В., Агапов И.И.,2016) [49,с.76;115,с.32;108,с.87].

«Существует три основных формы коллагена, которые используют при создании эквивалентов кожи: гидрогель, губка и решетка» (Биниенко М. А., 2018) [9, с.57;25, с.15-26;31, с.270;55, с.15;123, с.306;122, с.601;125, с.157]. Изготовление их является сложным технологичным процессом, который постоянно необходимо мониторить и проводится в специальных лабораториях [38, с.199;42, с.23;45, с.8]. Получить лицензию на производство бесклеточных заменителей проще, поэтому их больше, они основаны на аллогенных, ксеногенных или синтетических материалах. «Dermagraft, состоящий из криоконсервированных аллогенных фибробластов человека, которые получают из кожи крайней плоти новорожденных, выращенных на биodeградируемой сетке из полиглактина (викрила)» (Meleshina A.V., Bystrova A.S., Rogovaya O.S., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V., Zagaynova E.V.,2017) [26,с.15;32, с.305;39,с.22].

1.2. Использование клеточных продуктов в медицине

Клеточная терапия предполагает использование инновационных биомедицинских подходов, при которых клетки вводятся пациенту для лечения ряда патологических состояний путем замены больных или дисфункциональных клеток здоровыми функционирующими. В настоящее время накоплена достаточная доказательная база о клинической эффективности использования дермальных ФБ в комплексном лечении термических поражений кожи, келоидных рубцов, незаживающих ран и трофических язв.

«В 1961 г. L.Hayflick и P.S.Moorhead представили данные о том, что даже в идеальных условиях культивирования фибробласты эмбриона человека способны делиться только ограниченное число раз (50 ± 10). Было установлено, что при самом тщательном соблюдении всех мер предосторожности при пересевах клетки проходят *in vitro* ряд вполне морфологически различимых стадий (фаз), после чего их способность к пролиферации исчерпывается и в таком состоянии способны находиться довольно длительное время. В повторных опытах это наблюдение было многократно воспроизведено, последняя фаза жизни клеток в культуре была уподоблена клеточному старению, а сам феномен получил по имени автора название лимита Хейфлика. Более того, оказалось, что с увеличением возраста донора число делений, которые были способны совершить клетки организма, существенно уменьшалось» [29, с.22; 43, с.47;57, с.16]. Являясь основными клетками соединительнотканного слоя кожи, ФБ синтезируют факторы роста, ферменты и цитокины, стимулирующие рост коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон, участвуют в метаболизме межклеточного вещества, обновлении основных компонентов внеклеточного матрикса и обеспечивают гомеостаз и физиологическую морфофункциональную организацию кожи, а также запускают процессы репаративного гистогенеза.

Так как фибробласты сохраняют диплоидный каротип и не имеют возможности к перерождению в злокачественные клетки, началось их широкое

применение в клинической практике. «Было показано, что пересаженные аллогенные фибробласты оказывают непосредственное влияние на заживление ран (Ross, 1968) и на эпителизацию, что обосновывает применение аллофибробластов при ранах» [44, с.9;45, с.35;117, с.302;118, с.203]. Регенеративный потенциал ФБ обусловлен их высокой пластичностью и сохранением диплоидного кариотипа клеток в культуре, низкой экспрессией антигенов гистосовместимости и не онкогенностью, ограниченной продолжительностью жизни при трансплантации клеток и доступности биоматериала для их выделения.

Учитывая разнообразные факторы роста фибробластов, их начали использовать в пародонтологии. «О положительном эффекте лечения пародонтита с использованием культуры алло фибробластов, полученной из дермы плодов человека, недавно заявили отечественные исследователи [13, с.106-111]. Данными авторами был разработан новый способ лечения воспалительно-деструктивной формы пародонтита с использованием культуры аллофибробластов человека, заселённых на твёрдую мозговую оболочку» [36, с.65;75, с.23;86;89; с.511;95, р.92].

«Преимущество данного способа лечения пародонтита заключается в том, что в раневом ложе при имплантации ТМО и аллофибробластов не происходит так называемого процесса биодеградации плодного материала и культивированных аллофибробластов, а имплантат встраивается в костный дефект и трансформируется в дальнейшем в грубоволокнистую костную ткань альвеолярных отростков [21,с.22;59,с.15;61,с.20]. Культивированные аллофибробласты постоянно выделяют основной фактор роста (FGF), формируют экстрацеллюлярный матрикс, фибронектин и другие вещества, которые способствуют активации процессов ангиогенеза и дальнейшего остеогенеза» [10, с.99;12, с.22;51, с.237; 57, с.11].

Таким образом несмотря на огромное количество клеточных и

бесклеточных продуктов в регенеративной медицине нет ни одного которое в полной мере отвечало всем параметрам в полной мере. Перспективы расширения спектра применения дермальных ФБ в клеточной терапии заболеваний мягких тканей, в том числе связанных с эстетическими дефектами и способами их устранения, исходят из вышеперечисленных свойств этих клеток и могут являться основой для создания ТИК для замещения и/или восстановления повреждённых тканей и дефектов слизистой полости рта.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Исследования на животных выполнены в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), согласно

«Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1987 г.)

Проведены доклинические исследования способов лечения дефектов слизистой полости рта, оптимизирующие регенерацию. Эффективность способов изучена на экспериментальных моделях дефектов слизистой полости рта.

Эффект регенерации изучали на дефектах слизистой полости 30 крысах мужского и женского пола с массой тела в пределах $175,83 \pm 1,308$ - $187,33 \pm 2,72$ гр. Животные были распределены на пять групп по шесть в каждой. Первая группа использовали тканеинженерную конструкцию шелковая отваренная марля и аллофибробласты (ШМАЛФ).

Вторая группа применяли ШМАЛФ и дополнительно обкалывали аллофибробластами. Аббревиатура второй группы (ШМАЛФ+АЛФ).

В третьей группе применяли только шелковую марлю (ШМ).

Четвёртая группа только обкалывание аллофибробластами (АЛФ)

Пятая группа контрольная дефект не замещали (КГ).

Изучение периферической крови подопытных животных сделаны на базе аккредитованной научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) Ташкентского Научно-исследовательского института вакцин и сывороток на основании нормативных и методических документов Государственной системы Республики Узбекистан.

2.2. Клеточные линии

Получение первичной культуры дермальных ФБ неонатальных крыс. Первичную культуру дермальных ФБ крыс получали из кожи

новорожденных белых беспородных крыс, возрастом 1-3 дня. Эвтаназию лабораторных крыс проводили методом декапитации после усыпления ингаляционной газовой смесью, содержащей изофлуран, подаваемой через наркозно-дыхательный аппарат Mindray V60 ISOFLURANE. Животных обрабатывали 70% этанолом, после чего осуществляли забор биоптата кожи.

Выделение и культивирование фибробластов проводили в условиях стерильного бокса с соблюдением правил асептики. Культивирование клеток представляет собой ключевой этап лабораторного биотехнологического процесса, основанного на искусственном выращивании клеток в контролируемых условиях. Работа с культурами клеток проводилась в условиях стерильного бокса при соблюдении параметров и условий культивирования (рис. 2.2.1).



Рисунок 2.2.1. Стерильное боксовое помещение для работ с культурами клеток.

Изолированный фрагмент кожи механически очищали от подкожной жировой клетчатки, инкубировали в PBS в присутствии гентамицина/флуконазола в течение 10 мин с последующей 3х кратной отмывкой в стерильном PBS. Обработанный биоптат кожи механически измельчали и подвергали ферментативной обработке в растворе 0,25% трипсин/Версена в течение 30-60 мин при постоянном перемешивании и температуре 37⁰С.

После достижения конфлюэнтного монослоя в 80%, клетки снимали раствором 0,25% трипсин/Версена. Открепленные от поверхности клетки, ресуспендировали в PBS, переносили в стерильные центрифужные пробирки, объемом 15 мл, центрифугировали десять минут при 1500 об/мин.

Клеточный осадок ресуспендировали в ППС DMEM/F12, общее количество клеток оценивали с использованием автоматизированного метод подсчёта с использованием счётчика клеток CytoSmart (Corning, США). Вычисление процента жизнеспособных клеток производили путём окрашивания аликвоты клеток витальным красителем трипановым синим (0,4%) в соотношении 1:1 (рис.2.2.2).

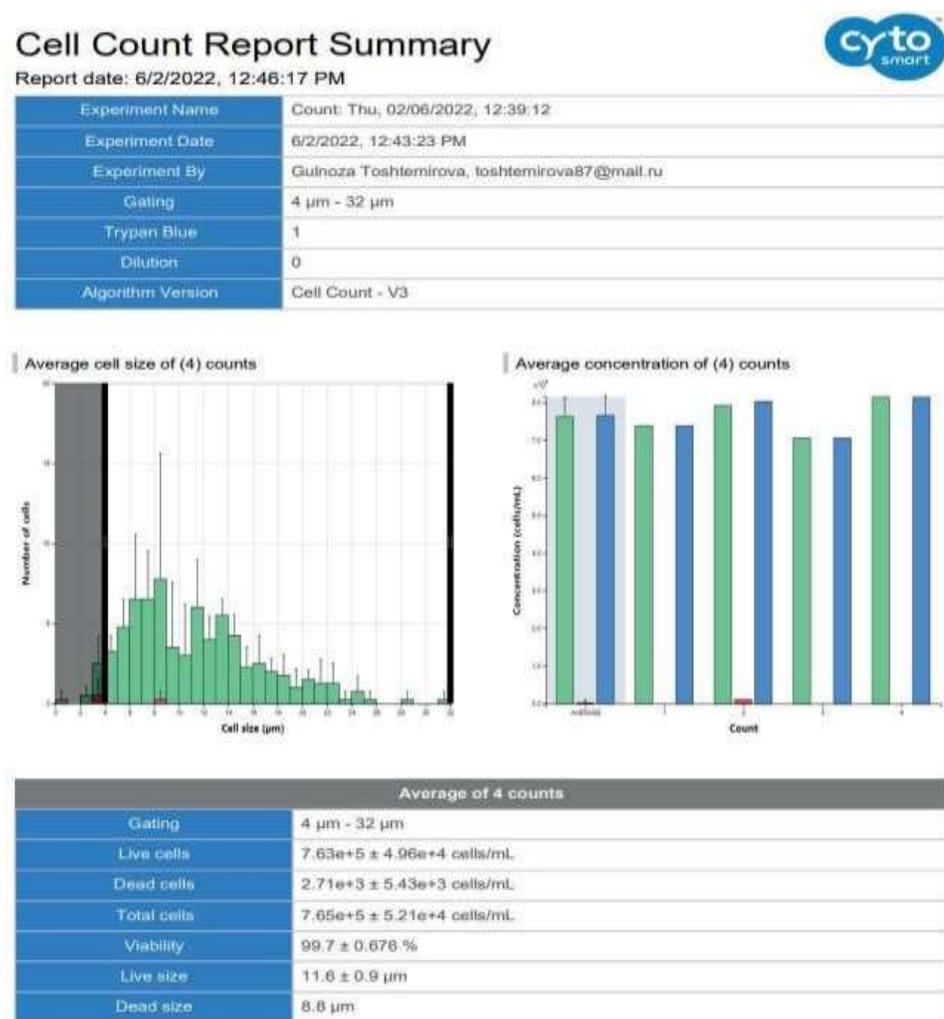


Рисунок 2.2.2. Электронный отчёт анализа жизнеспособности культуры дермальных ФБ новорожденных крыс. Анализ выполнен

на автоматическом счётчике клеток CytoSmart (Corning).



Рис.2.2.3. Культуральные флаконы, пробирки и планшеты.

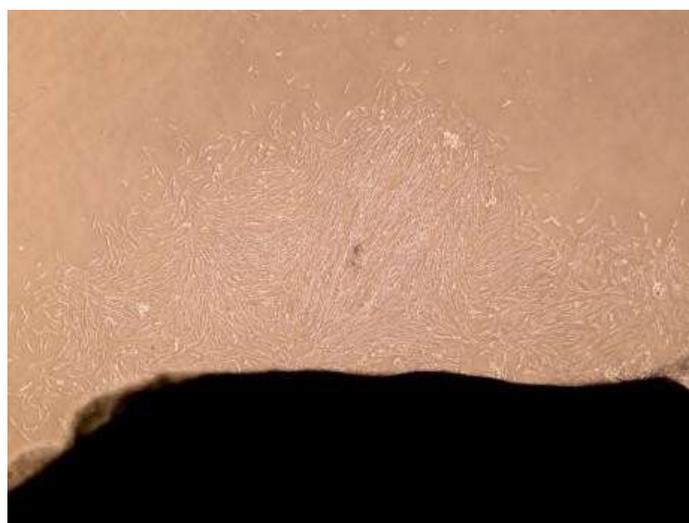


Рис.2.2.4. Экспансия клеток неонатальных фибробластов из лоскута кожи новорожденной крысы. 20x увеличение (EVOS FL, Life Technologies)

Культивирование клеток осуществляли в Дульбеко модифицированной среде Игла (DMEM «Sigma»). После достижения конfluence монослоя, лоскут удаляли из чашки Петри, клетки снимали с использованием раствора Версена («Sigma»), производили подсчёт и высевали в культуральные флаконы (рис.2.2.3;2.2.4).

2.3. Оценка биосовместимости применяемых подложек

Для создания биосовместимых тканеинженерных подложек были использованы шелковая отваренная марля. Стерильное раневое покрытие было нарезано на лоскуты размером 1 см², выстелены на дно стерильных культуральных чашек Петри, диаметром 3,5 см², после чего в чашку вносили суспензию фибробластов в среде ДМЕМ и культивировали в CO₂ инкубаторе. Оценку биосовместимости и отсутствия цитотоксического эффекта производили каждые 2 суток путём визуализации клеток при микроскопировании образцов.

После формирования монослоя клеток в чашке Петри, подложку снимали и переносили в новую чашку. Далее производили оценку жизнеспособности клеток на подложке и мониторинг экспансии клеток из неё в окружающую среду.

2.4. Клеточные методы исследования

Оценку жизнеспособности культивируемых фибробластов производили по морфометрическим параметрам. Контрольными показателями культуры фибробластов служили следующие характеристики (Табл.2.7.1;2.7.2).

Таблица 2.7.1

№	Наименование показателя	Характеристика и норма показателя
1	Внешний вид	Опалесцирующая жидкость желтовато-розового цвета (взвесь клеток в питательной среде ДМЕМ) или бесцветная опалесцирующая жидкость (взвесь клеток в физиологическом растворе).
2	Количество жизнеспособных	Не менее 90% от общего количества клеток

	клеток	
3	Морфологические особенности клеток, способность к образованию монослоя	Клетки в суспензии округлой формы, при посеве прикрепляются ко дну культурального флакона и образуют монослой веретеновидных пролиферативно-активных клеток через 24 - 48 ч после посева на носитель в питательной среде
4	Стерильность	Должны быть стерильными
6	Содержание клеток в 1 мл жидкости	Не менее $1 \cdot 10^6$ клеток ($\pm 5\%$)

Культура фибробластов для клеточной терапии должна соответствовать требованиям спецификации, то есть это должна быть стерильная опалесцирующая жидкость желтовато-розового цвета (взвесь клеток в питательной среде DMEM/F12) или бесцветная опалесцирующая жидкость (взвесь клеток в физиологическом растворе), количество жизнеспособных клеток должно составлять не менее 90% от общего количества, клетки в суспензии должны быть округлой формы, при посеве прикрепляться ко дну культурального флакона и образовывать монослой веретеновидных пролиферативно-активных клеток через 24 - 48 ч после посева на носитель в питательной среде, содержание клеток в 1 мл должно быть не менее $1 \cdot 10^6$ клеток ($\pm 5\%$), по фенотипу клетки (содержание клеток с определёнными маркерами) должны содержать фибронектин – не менее 25%, виментин – не менее 95%. Таким образом, была разработана тканеинженерная конструкция для оптимизации регенерации слизистой оболочки полости рта, которая состоит из шелковой отваренной медицинской марли с аллофибробластами.

2.6. Гематологические и биохимические методы исследования

Были проанализированы гематологические показатели: гемоглобин, эритроциты и лейкоциты, цветной показатель, ретикулоциты, палочкоядерные и сегментноядерные лейкоциты, тромбоциты, базофилы, эозинофилы, лимфоциты, моноциты и СОЭ (рис.2.6.1).

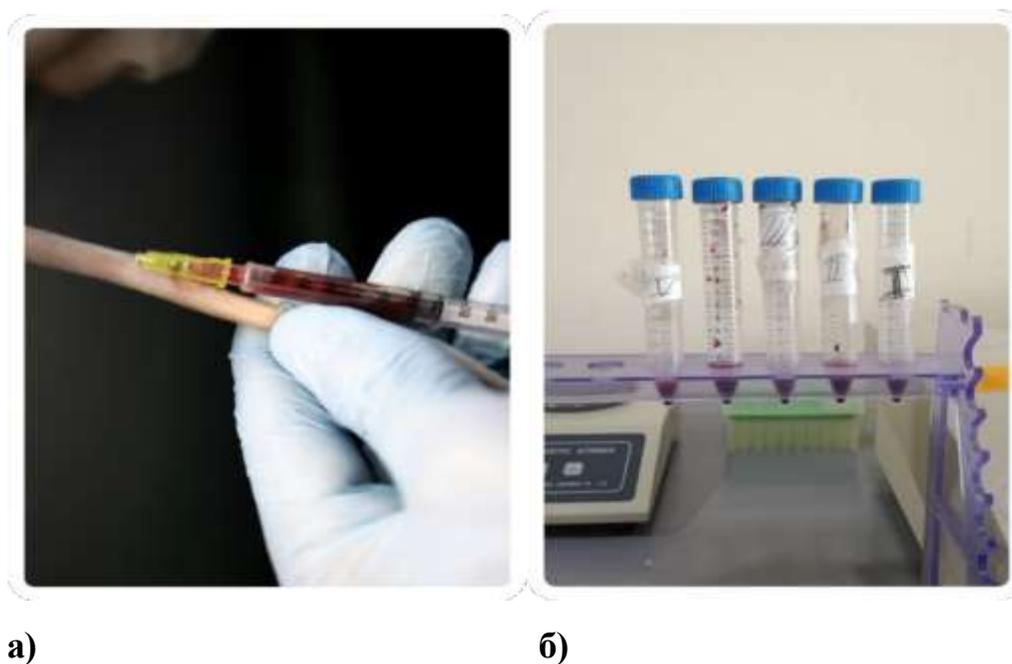


Рис.2.6.1. Этапы взятия крови у экспериментальных животных для проведения гематологических и биохимических методов исследования. а- взятие крови из крысиного хвоста; б-пробирки для центрифугирования с кровью экспериментальных животных по группам.



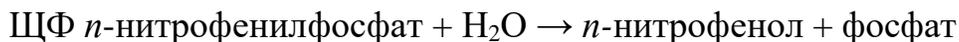
Рис.2.6.1. Анализатор гематологический Rayto RT- 1904C

Исследование крови крыс проводили на гематологическом анализаторе аппарате Rayto RT- 1904C (Китай, ISO9001 и ISO13485) (рис.2.6.1).

Метод определения щелочной фосфатазы

Щелочную фосфатазу определяли с использованием коммерческого набора «ALP Kit» (Cypress Diagnostics, Belgium).

Принцип метода заключается в проведении реакции:



Скорость образования *n*-нитрофенола прямо пропорциональна активности щелочной фосфатазы в пробе.

С помощью спектрофотометра (СФ-46) при длине волны 405 нм изучали оптическую плотность пробы;

- длина оптического пути: 10 мм;
- температура: 37°C.

Довели температуру рабочего реагента до температуры анализа. К 1000 мкл рабочего реагента прибавили 20 мкл пробы, перемешали и поместили в термостатируемое кюветное отделение анализатора. Через 1 мин начали считывание оптической плотности через равные промежутки времени в течение 1–3 мин. Количество считываний было не менее трёх. Для остановки реакции приготовили раствор натрия гидроокиси, 0,5 моль/л (20 г/л). Перемешали, выдержали каждую пробу точно 5 мин по секундомеру при температуре 37°C и добавили по 1000 мкл раствор натрия гидроокиси, 0,5 моль/л. Перемешали и измерили оптическую плотность растворов против дистиллированной воды. Окраска была стабильна в течение 30 мин.

Расчет. Активность ЩФ (А) в пробе в МЕ рассчитали по формуле:

$$A = DE/\text{мин} \times \text{фактор, где значение фактора: } 2757.$$

Определение аланин-аминотрансферазы (АЛТ) в кровяной сыворотке

Определение аланин-аминотрансферазы (АЛТ) осуществлялось с помощью наборов GPT ((alt) (CYPRESS Diagnostics, Бельгия)).

Фермент аланин-аминотрансфераза (АЛТ) или глутамат пируват трансминаза (ГПТ) участвует в большинстве биохимических цепных реакций в различных тканях. Главный источник АЛТ имеет печёночное происхождение и приводит к определению АЛТ при исследовании печёночных болезней. Повышение концентрации данного фермента в сыворотке наблюдается при гепатите, циррозе печени и обтурационной желтухе. Уровни АЛТ лишь немного увеличиваются у пациентов после инфаркта миокарда.

Принцип метода:

Кинетическую активность АЛТ определяли согласно следующей реакции:

*АЛТ альфа-кетоглутарат + аланин → глутамат + пируват

Пируват + NADH + H⁺ → лактат + NAD⁺

Уровень, расходуемого NADH определяли фотометрически, и он прямо пропорционален активности ГПТ в пробах.

Принцип основан только на исследования in vitro

Подготовка

Растворили одну таблетку субстрата в 15 мл буфера и взболтали.

Стабильность: 72 часа в 15-25°C или 21 день в 2-8°C.

С помощью спектрофотометра (СФ-46) при длине волны 340 нм изучали оптическую плотность пробы.

Концентрацию аланин-аминотрансферазы рассчитали по формуле: ALT
(U/l) = (Δ Abs./min x 1750 x 1,00

Определение аспартат-аминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови

Определение аспартат-аминотрансферазы (АСТ) осуществляли с помощью набора GOT ((ACT) (CYPRESS Diagnostics, Бельгия)).

Сывороточная аспартат аминотрансфераза (АСТ), также известная как щавелевоуксусный трансминаза глутаминовой кислоты, является ферментом

тканей, которые катализируют амино- и кетогруппы между альфа-амино и альфа-кетокислотами. АСТ широко распределён в различных тканях, преимущественно в сердечной, печёночной, мышечной и почечной тканях. Альтерация этих тканей приводит к повышению концентрации АСТ (SGOT) в общем кровообращении. При таких болезненных состояниях, как инфаркт миокарда уровень сывороточной АСТ увеличивается и достигает своего пика спустя 48 - 60 часов после начала болезней гепатобилиарной системы, таких как цирроз печени, метастатическая карцинома, и вирусный гепатит.

Принцип метода

Кинетическую активность АСТ определяли согласно следующей реакции: Альфа-кетоглутарат + Аспарат → Глутамат + Оксалоацетат
Эфир щавелевоуксусной кислоты + NADH + H⁺ → NAD
Принцип основан только на исследования in vitro

Принцип работы

Растворили одну таблетку субстрата в 15 мл буфера и взболтали.

С помощью спектрофотометра (СФ-46) при длине волны 340 нм изучали оптическую плотность пробы.

Концентрацию аланин-аминотрансферазы рассчитали по формуле: $AST (U/l) = (\Delta Abs./min \times 1750 \times 1,00)$

Определение общего белка в сыворотке крови

Определение общего белка осуществляли с помощью набора Total protein (colorimetric test. Biuret (CYPRESS Diagnostics, Бельгия)) по биуретовой реакции. В щелочной среде с сульфатом меди белки окрашиваются в фиолетовый цвет, по интенсивности окрашивания, оценивают содержание его в сыворотке крови.

Концентрацию общего белка рассчитали по формуле: $Total\ protein\ (g/dl) = (Abs.sample/Abs.stand) \times stand.conc.$

2.7. Гистоморфологические исследования органов тканей и экспериментальных животных

Для испытания предложенных тканеинженерных конструкций (50 мг/кг) использовались половозрелые крысы. После создания модели дефекта при помощи швов устанавливалась тканеинженерная конструкция, либо проводилось инъекционное лечение, соответственно группам экспериментальных животных. По истечении 3 и 7, 28 суток осуществляли забой животных и брали для исследования органы – мозг, сердце, лёгкое, печень, селезёнка, почка, желудок, двенадцатиперстная кишка, тонкая кишка, толстая кишка, лимфоузел и участок слизистой (рис.2.7.1).

Удалённые органы и участки слизистой полости рта животных фиксировали в 10% забуференном растворе формалина в течение 24 часов. Органы после фиксации запускались в гистопроцессор автоматического карусельного типа «Thermo Fisher STP 120» (TFS, США) для дегидратации, пропитки и парафинизации. Полученные на ротационном микротоме 3-4 мкм срезы HM 325 (TFS, США) окрашивали гематоксилином и эозином и изучали на разных увеличениях микроскопом Axio Lab.A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали с помощью цифровой видеокамеры SDPTOP.



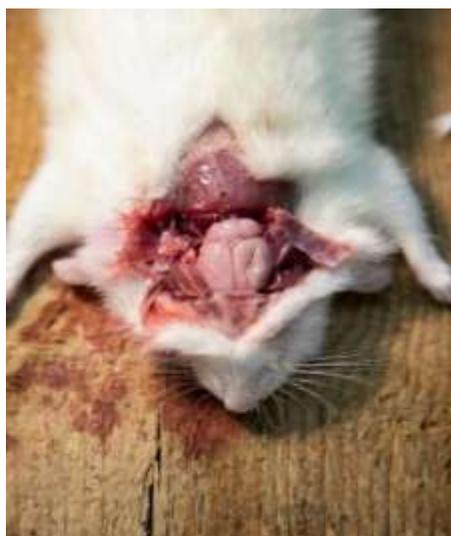
а)



б)



в)



г)

**Рис.2.7.1. Изъятие внутренних органов у экспериментальных органов:
а-лимфатический узел; б-сердце; в-почки; г-головной мозг.**

2.8. Моделирование экспериментального дефекта слизистой полости рта

В полости рта экспериментального животного создавали с помощью скальпеля глубокий дефект слизистой размером 0,7 см в диаметре в области щеки, дополнительно проводили травматизацию дна раны скальпелем.

С помощью узловых швов закрепляли шелковую отваренную марлю на дефект в первой, второй группе и третьей группах (рис.2.8.1;2.8.2). Во второй группе проводили дополнительно обкалывание аллофибробластами. В четвёртой группе только вводили аллофибробласты на равном расстоянии. Всего получалось четыре вкола. Пятая группа была контрольная в ней дефект ничем не закрывался. За животными наблюдали ежедневно. После выведения животных из эксперимента проводили гистологические исследования.



Рис.2.8.2. Первая группа. Область дефекта закрыта тканеинженерной конструкцией из аллофибробластов на шелковой отваренной марле. Конструкция фиксирована узловыми швами по краям дефекта.

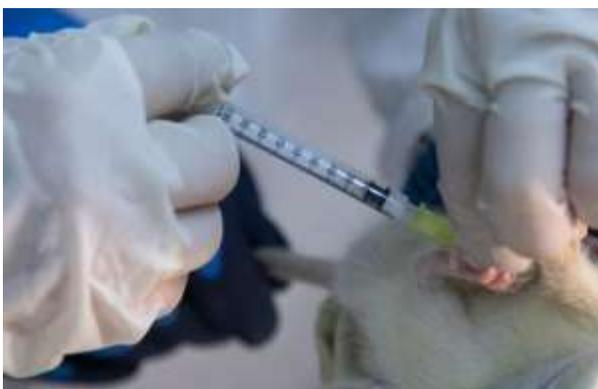


Рис.2.8.3. Вторая группа. Область дефекта закрыта тканеинженерной конструкцией из аллофибробластов на шелковой отваренной марле. Конструкция фиксирована узловыми швами по краям дефекта, дополнительно в четырёх точках вокруг дефекта проведены инъекции аллофибробластов.

2.9. Методы статистической обработки

«Среднее арифметическое (M) \pm стандартное отклонение (SD) в случае нормального распределения и как медиана (Md) и квантили (Q) или (SD) при других распределениях количественных данных с уровнем достоверности $p < 0,05$.

Компьютер Pentium-IV с программами Microsoft Excel и Microsoft Access, с расчетом среднеарифметической изучаемого показателя (M), ее стандартной ошибки (m), показателей достоверности (p) и критерия Стьюдента (Зайцев В.М. и др. 2003г.)» [60, с.138].



а)



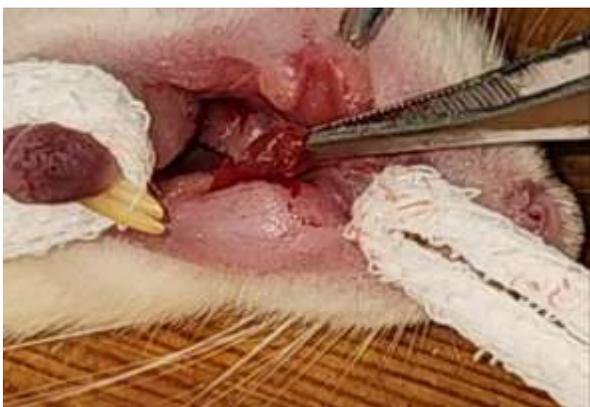
б)



в)



г)



д)



е)

Рис.2.7.1. Экспериментальная модель дефекта слизистой оболочки (а, б- внутрибрюшинно вводили наркотическое вещество Уретана из расчёта 1 г на 1 кг массы тела животного, г- придание животному статичного положения и фиксация головы; д-создание с помощью скальпеля в щечной области дефекта слизистой оболочки диаметром 0,7 х0,7 см; е-фиксация узловыми швами шелковой отваренной марли с аллофибробластами.

ГЛАВА III. РАЗРАБОТКА И ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

3.1. Создание тканеинженерной конструкции для оптимизации заживления дефектов слизистой полости рта в эксперименте.

Для получения клеточной линии с определенным клеточным составом необходимо обеспечить наличие помещения с асептическими условиями класса А.

В условиях стерильного бокса лаборатории биоптат кожи промывали физиологическим раствором или фосфатно-солевым буфером. Основными параметрами культивирования клеток млекопитающих являются температура, состав газовой среды, показатель рН культуры. Оптимальной температурой для культивирования культур ФБ является 37 °С. Оптимальное содержание углекислого газа - 5 %. Показатель кислотности (рН) среды, в которой осуществляли культивирование ФБ находится в пределах 7.2–7.4 и поддерживался буферностью культуральной питательной среды, в которой осуществляли выращивание клеток.

Метод дезагрегации заключался в обработке биоптата кожи в растворе 0,25% трипсин/Версена при 37С° в течение 30-60 минут, фильтровании суспензии, 2-кратном центрифугировании/ ресуспендировании клеточного осадка.

Пассаж лоскута осуществляли эпидермальной поверхностью на адгезивную поверхность культуральной посуды.

Клетки и лоскуты культивировали в ППС DMEM/F12 при 37°С и атмосфере 5% CO₂. Формирование монослоя ФБ, полученных методом дезагрегации, наблюдалось на 3-4 сутки, тогда как выход клеток из лоскутов наблюдался лишь на 7-12 сутки, период эффективной миграции наступал только на 20 – 24 сутки (рис.3.1.1). После формирования конфлюэнтного

монослоя, клетки пересевали в соотношении 1:1 n раз пассажей для наработки паспортизированной популяции однородных клеток.

Создание и обеспечение физических сбалансированных условий культивирования дермальных ФБ обеспечивается в программируемых культуральных CO₂-инкубаторах, ПО которых позволяет устанавливать контролируемые параметры содержания кислорода и углекислого газа, поддерживать необходимую температуру и влажность в рабочей камере прибора (рис.3.1.1).



Рис. 3.1.1. CO₂ Инкубатор с водяной рубашкой NBS Galaxy 170R -1.

Клетки, выделенные методом дезагрегации имели ограниченное число пассажей, напротив, пассаж лоскута позволял получить неограниченный выход клеток за счет пересева лоскутов. Комбинирование методов позволило получить срочное количество жизнеспособных клеток методом дезагрегации в течение 2 недель и поддерживать культуру дермальных ФБ в течение длительного времени методом пассажа лоскута.

Клетки, выделенные методом дезагрегации имеют ограниченное число пассажей, а пассаж лоскута позволяет получить неограниченный выход клеток за счёт пересева лоскутов. Комбинирование методов позволяет получить срочное количество жизнеспособных клеток методом дезагрегации в течение двух недель и поддерживать культуру дермальных фибробластов в течение

длительного времени методом пассажа лоскута (рис.3.1.2).

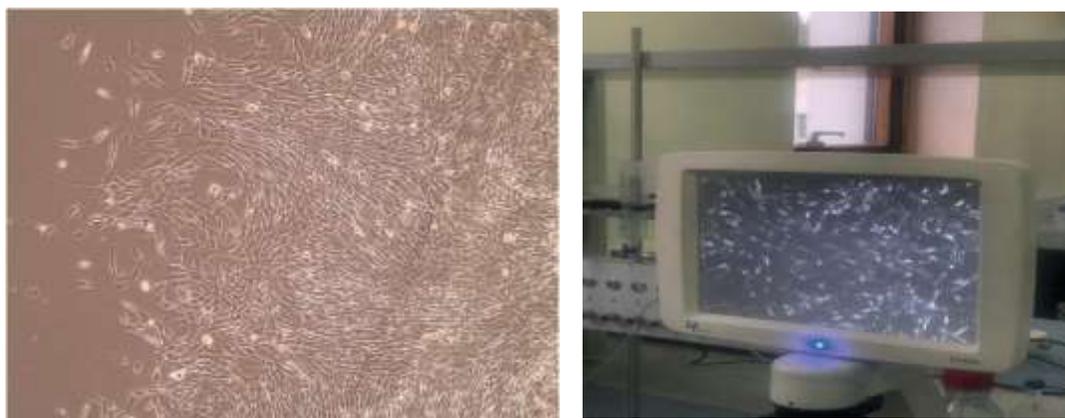


Рисунок 3.1.2. Формирование и монослей дермальных ФБ человека *in vitro*. Микроскопирование культуры дермальных ФБ с использованием EVOS XL CORE (Invitrogen, США).

Паспортизация клеточной культуры. Паспортизация клеточной культуры предшествует этапу создания ТИК. Паспортные характеристики культуры включают состав, качество и результаты контроля безопасности, и является основанием для включения культуры в ТИК.

Согласно общей структуре, паспорт должен состоять из четырёх блоков. Первый блок должен содержать общую информацию о клетках, (о доноре, в случае аллогенного биоматериала).

Второй блок полностью посвящён жизнеспособности клеток и включает данные о морфометрических характеристиках, их жизнеспособности, фенотипе, концентрации и объёме. В третьем блоке отражаются результаты об отсутствии содержания в них инфекционных агентов, общих для всех клеток, включая специфические.

Определение количества жизнеспособных клеток проводили с помощью системы визуализации и подсчёта живых клеток CytoSMART CytoSmart (Corning)(рис.3.1.3;3.1.4).

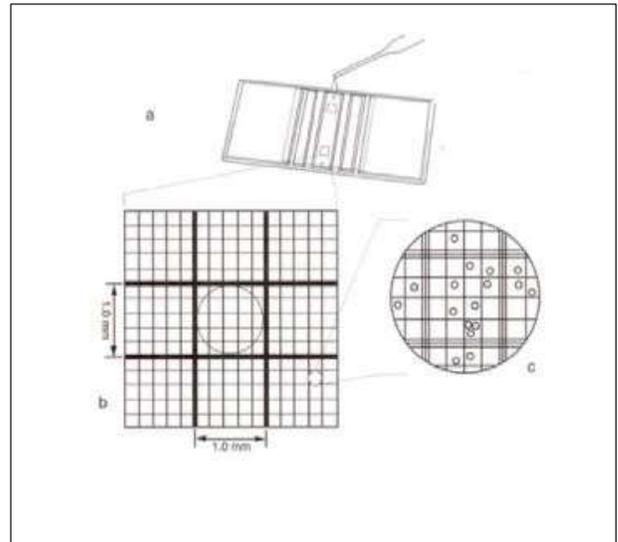
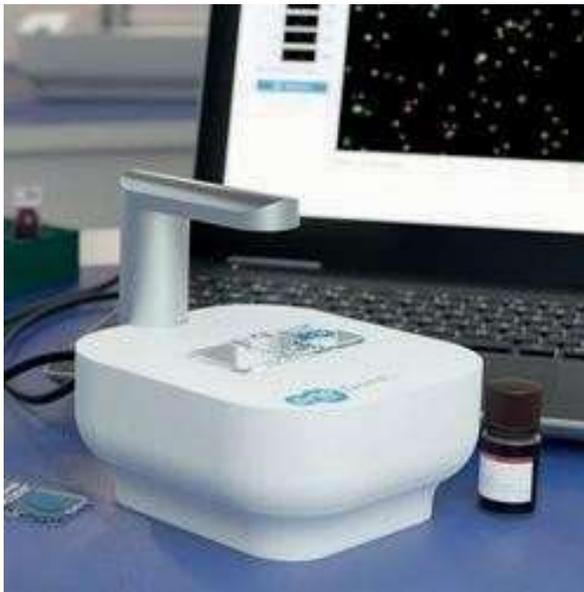


Рисунок 3.1.3. Подсчёт клеток. Слева – Система визуализации и подсчёта живых клеток CytoSMART CytoSmart (Corning). Справа – устройство и сетка камеры гемоцитометра.

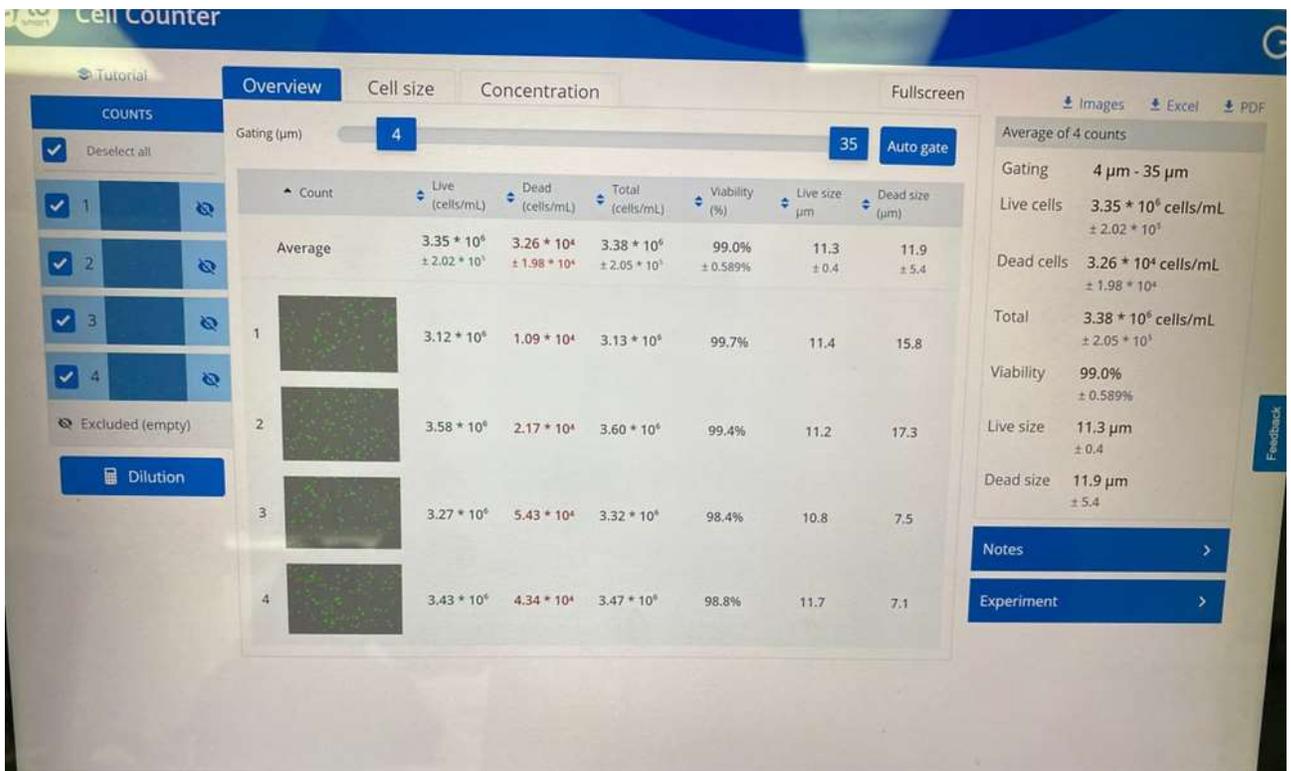


Рис.3.1.4. Отчет количества жизнеспособных клеток, проведённый

на приборе CytoSMART CytoSmart (Corning).

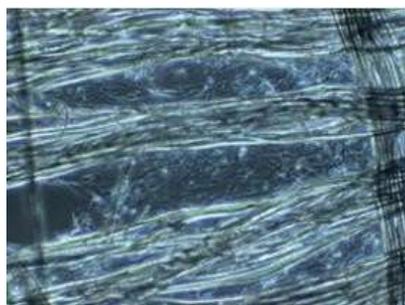
Стерильные РП были нарезаны на лоскуты размером 1 см², выстелены на дно стерильных культуральных чашек Петри, диаметром 3,5 см², поверх подложки высевали суспензию ФБ пассаж-3 в количестве 105 клеток/мл в ППС DMEM/F12, подложку прижимали покровными стёклами и культивировали при 37°С и атмосфере 5% CO₂.

Оценка биосовместимости тканеинженерной конструкции. Оценку биосовместимости подложки и отсутствие цитотоксического эффекта производили каждые 2 суток путём визуализации клеток при микроскопировании образцов. РП, заселённое дермальными фибробластами переносили в новую культуральную чашку Петри, продолжали культивировать при стандартных условиях и наблюдали миграцию клеток в окружающую среду. Подтверждение наличия жизнеспособных ФБ в разработанной ТИК производили методом флуоресцентной микроскопии с использованием витальных флуоресцентных красителей Hoechst 33342 и Calcein AM (рис.3.1.5).

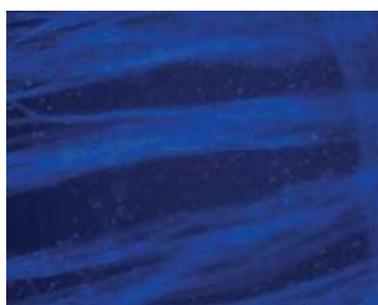
Полученные результаты указывают на то, что раневое покрытие не обладает цитотоксическим действием на клетки, структура покрытия идеально подходит для прорастания клеток вглубь покрытия, формируя тканеподобную структуру, пересадка сформированной ТИК не снижает пролиферативный потенциал внедрённых в покрытие клеток, о чем свидетельствует формирование монослоя клеток за пределами ТИК.

Таким образом, использование автоматической системы подсчета клеток позволяет отследить установочные параметры подсчета клеток, включающие время и дату проведения исследования, охарактеризовать клеточный состав культуры ФБ, включающие диапазон размеров частиц, принятых к подсчету; размеры живых и мертвых клеток (мкм); общее количество клеток/мл; количество живых и мертвых клеток/мл; процент

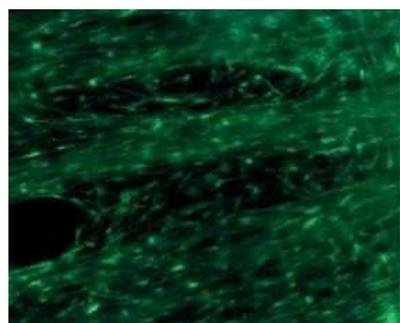
жизнеспособных клеток (%).



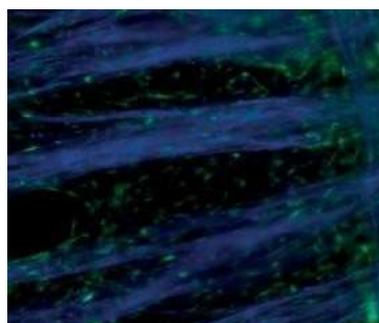
Светлое поле



Ноеchst 33342



Calcein AM



Совмещенное изображение

Рисунок 3.1.5. Визуализация образца тканеинженерной конструкции, разработанной на основе жизнеспособных ФБ дермы в носителе «Отваренная шелковая медицинская марля». Светлое поле – неокрашенный нативный препарат, Ноеchst 33342 – окрашенные ядра клеток синим красителем Ноеchst, Calcein AM – окрашенная цитоплазма жизнеспособных клеток витальным зелёным красителем CalceinAM, совмещённое изображение – пространственное совмещение (колокализация) флуоресцентных изображений. Оригинальное изображение получено с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа EVOS FLCOLOR (Invitrogen, США).

3.2. Оценка субхронической токсичности по состоянию внутренних органов экспериментальных животных

Для испытания предложенных тканеинженерных конструкций использовались половозрелые крысы. По истечении 28 дней осуществляли забой животных и брали для исследования органы. Были изучены головной мозг, сердце, легкие, печень, селезёнка, почки, желудок (рис.3.2.1-3.2.10). Препараты окрашивались гематоксилин – эозином. Гистологическая оценка внутренних органов проводилась только во второй группе животных, где применялась шелковая марля с аллофибробластами и инъекции аллофибробластов.

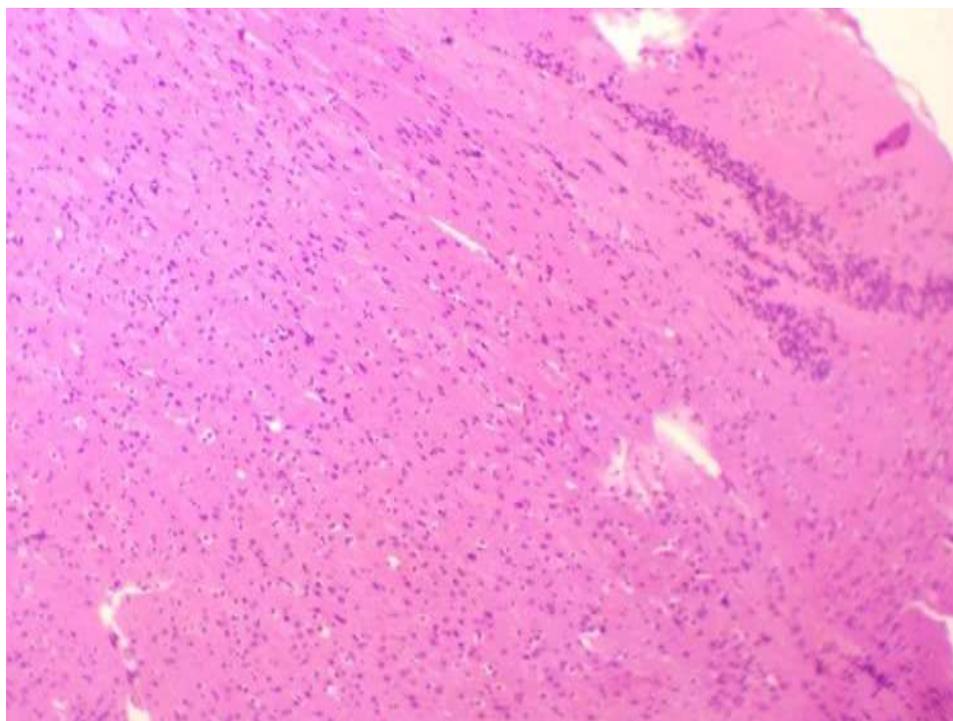


Рис.3.2.1. Головной мозг. Границы между белым и серым веществом определяются. (Вторая группа (ШМФ+ФБ). Окраска гематоксилин-эозином Увеличение объектива 100.

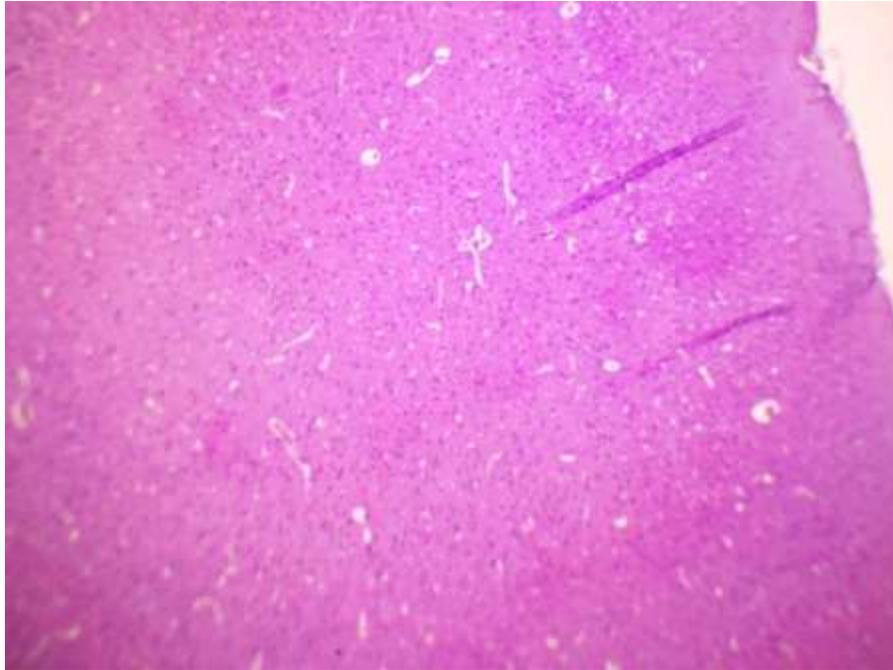


Рис.3.2.2. Фрагменты головного мозга с равномерным расположением нейроцитов и без признаков патологического повреждения. Цитоархитектоника сохранена. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Окраска гематоксилин-эозином Увеличение объектива 40.

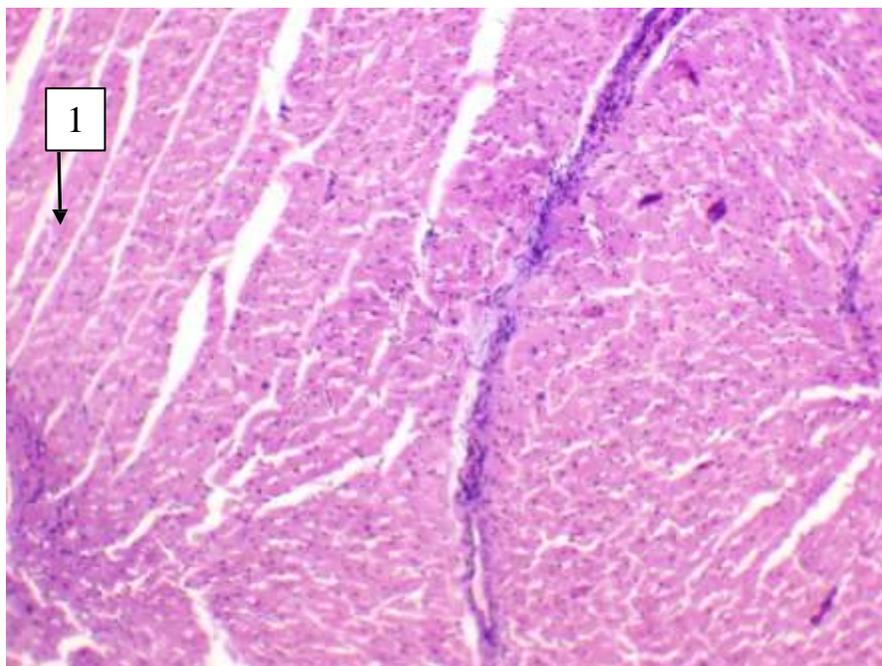


Рис.3.2.3. Кардиомиоциты фрагментированы. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 100.

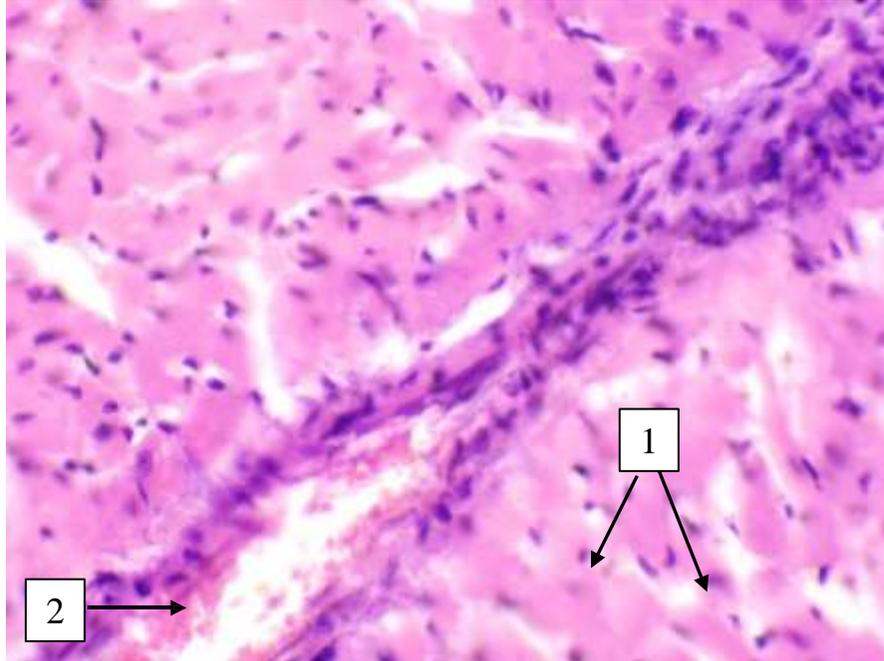


Рис.3.2.4. Волокнистая структура и ядра кардиомиоцитов сохранены-1. Гиперемия-2. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 40.

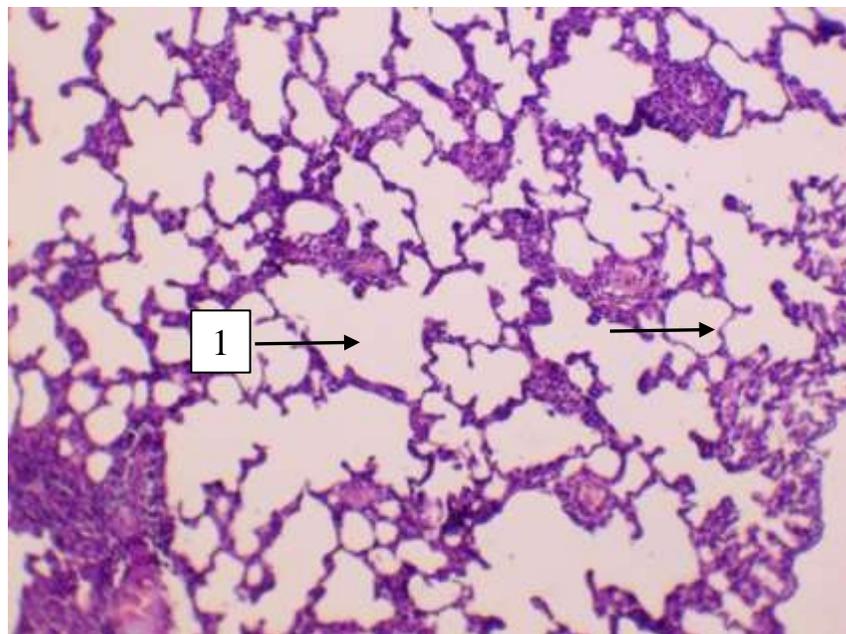


Рис. 3.2.5. Легкое воздушное, просвет альвеол свободный- А, эпителий местами истончен-В. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Окраска гематоксилин-эозином Увеличение объектива 100.

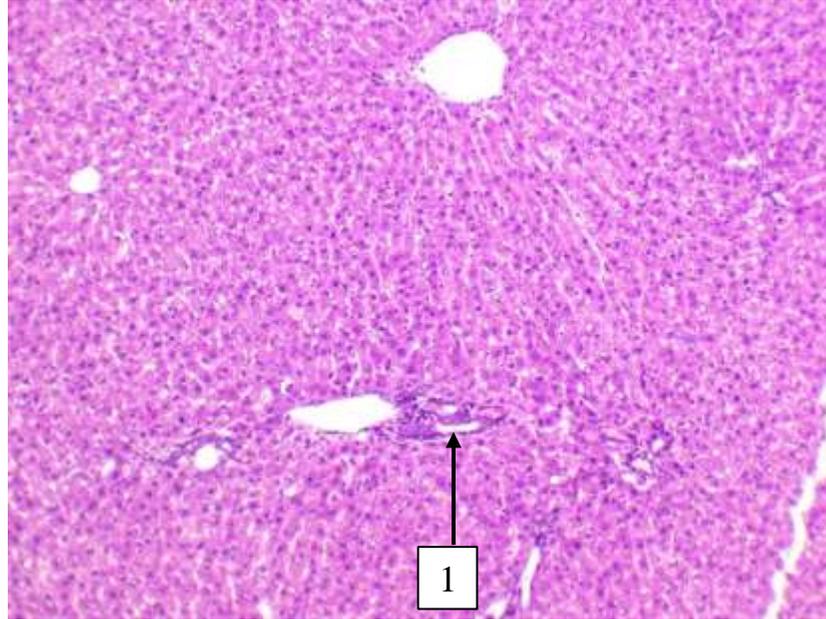


Рис.3.2.6. Печень дольчатого строения, незначительная гистиогенная инфильтрация по перипортальному тракту-1. Очагов дистрофии, некроза, воспалительной инфильтрации нет. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Увеличение объектива 40.

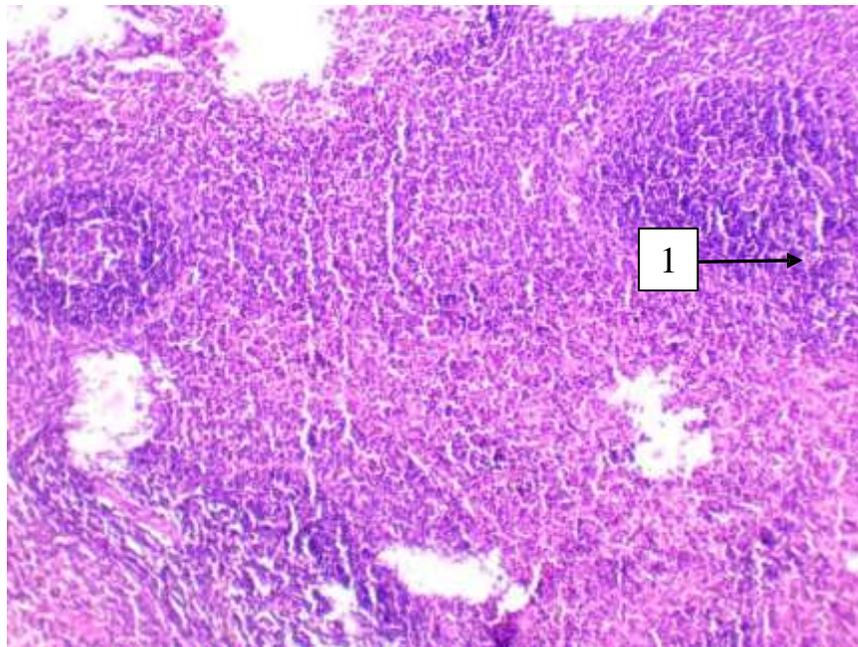


Рис.3.2.7. Препарат селезенки. Структура не нарушена. Белая пульпа и красная пульпа определяется. Гиперплазия лимфоидных фолликулов-1. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Увеличение объектива 100.

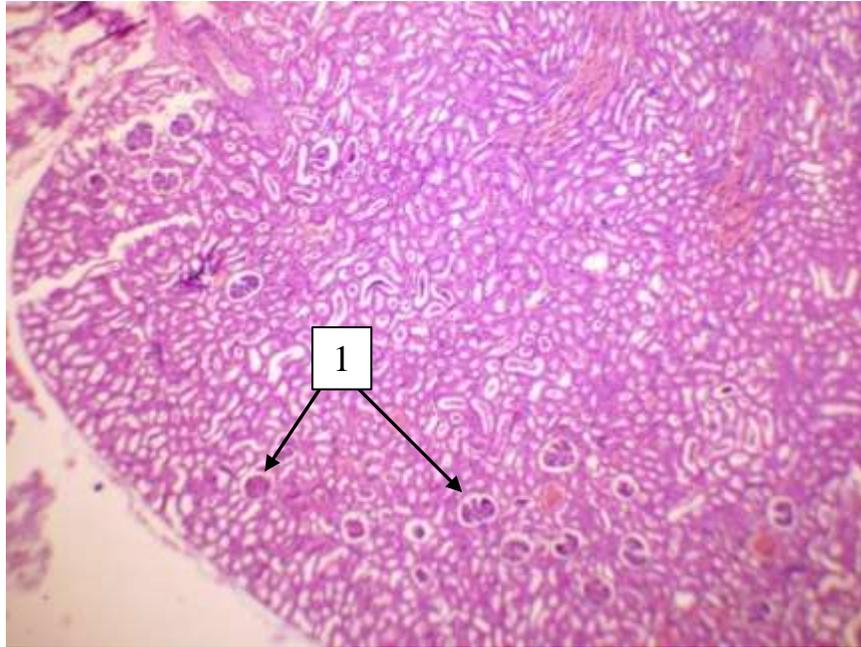


Рис.3.2.8. Почка. В поле зрения определяются несколько клубочков-1, равновеликие по размеру, округловатой формы и канальцы. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 40.

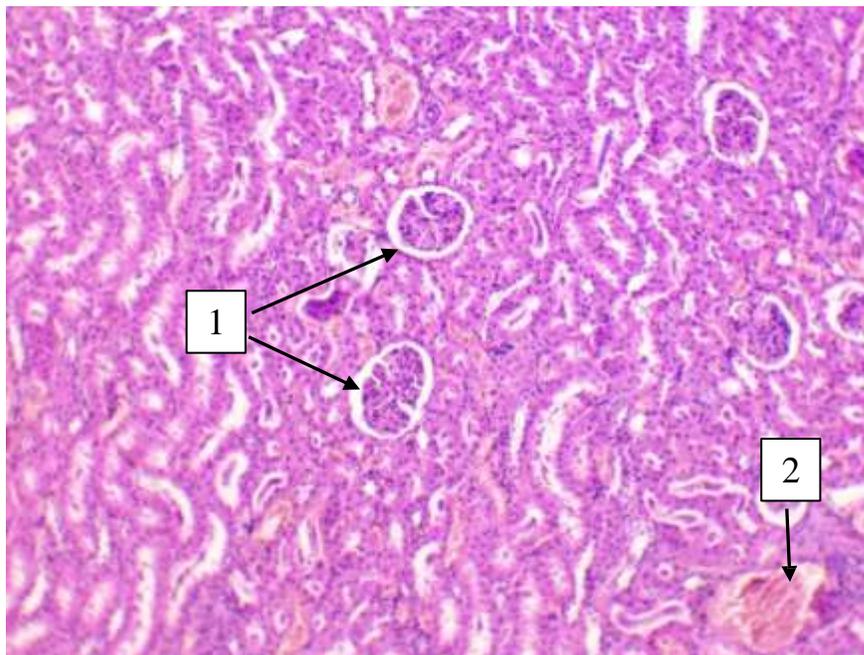


Рис.3.2.9. Под большим увеличением объектива почки клубочки равновеликие-А, полнокровные сосуды-Б. Эпителий прямых и извитых канальцев содержит ядра. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 100.

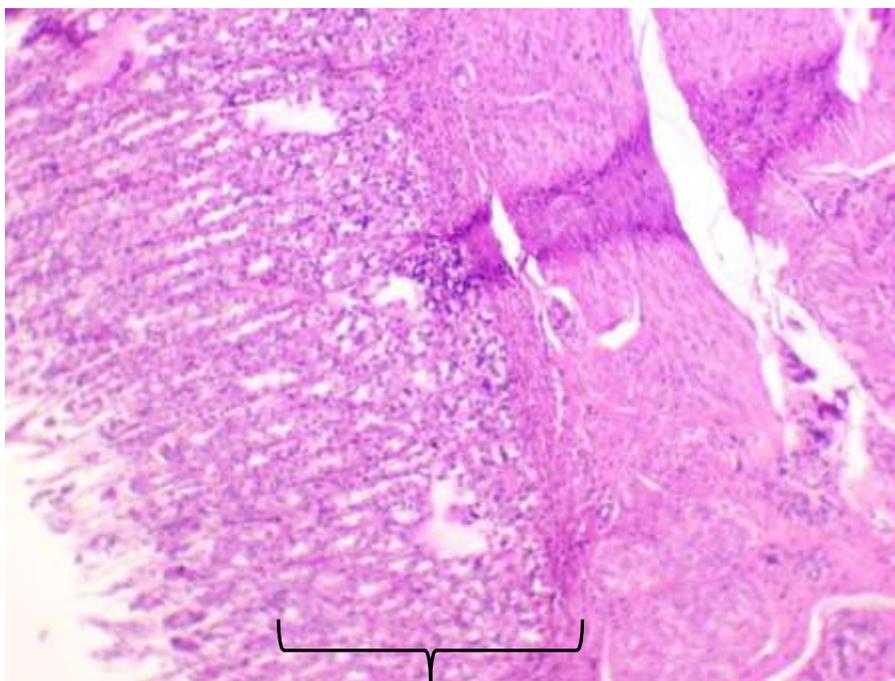


Рис.3.2.10. Препарат желудка. Очагов дистрофии, некроза, воспалительной инфильтрации нет. Слизистая, подслизистая и собственная пластинка без изменений. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Увеличение объектива 40.

На фоне имплантации тканеинженерной конструкции ШМАЛФ+АЛФ не наблюдается токсического эффекта на организм экспериментальных животных, что подтверждается изучением состоянием жизненно важных органов и динамикой животных и относительного веса внутренних органов, что подтверждает безопасность проводимой клеточной терапии(рис.3.2.13;3.2.14).

Были изучены гематологические и биохимические показатели периферической крови и сыворотки экспериментальных животных для оценки. Была изучена динамика содержания содержания гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, эозинофилов, лимфоцитов, гранулоцитов, гематокрита, средней концентрации гемоглобина в эритроците, относительной ширины распределения эритроцитов, тромбоцитов в абсолютных числах, гетерогенности тромбоцитов, среднего объёма тромбоцитов, тромбокриты, абсолютного содержания лимфоцитов и смеси моноцитов, базофилов и эозонофилов, СОЭ.Определено, что они находятся на

одном уровне с контрольными значениями, и практически не отличаются от показателей нормы и между собой в группах наблюдения (рис.3.2.11;3.2.12). Для исследования биохимических показателей собирали кровь для получения сыворотки крови, которую до исследования хранили при -30 °С. В сыворотке крови проводили определение уровней глюкозы, аминотрансминазных ферментов (АЛТ, АСТ), щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТР), общего белка, альбумина, холестерина, глюкозы и общего, прямого и непрямого билирубина. По данным диаграммы (рис.3.2.13) приведены данные исследования в сыворотке крови крыс уровня АЛТ и АСТ, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТР) не превышают показатели нормы. По данным диаграмм (рис.11) показатели общего белка, альбумина, холестерина, глюкозы и общего, прямого и непрямого билирубина и глюкозы также не выходят за границы нормальных показателей.

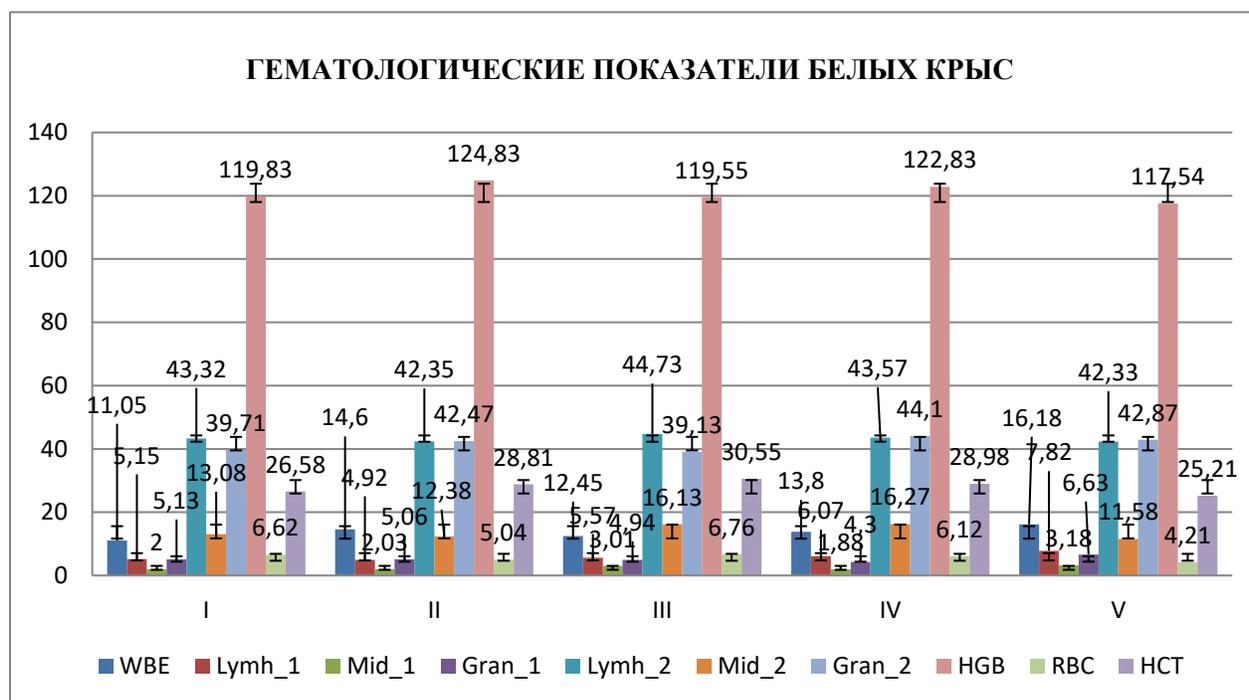


Рис.3.2.11. Диаграмма гематологических показателей крови крыс (n= 5, m±m) p>0,05

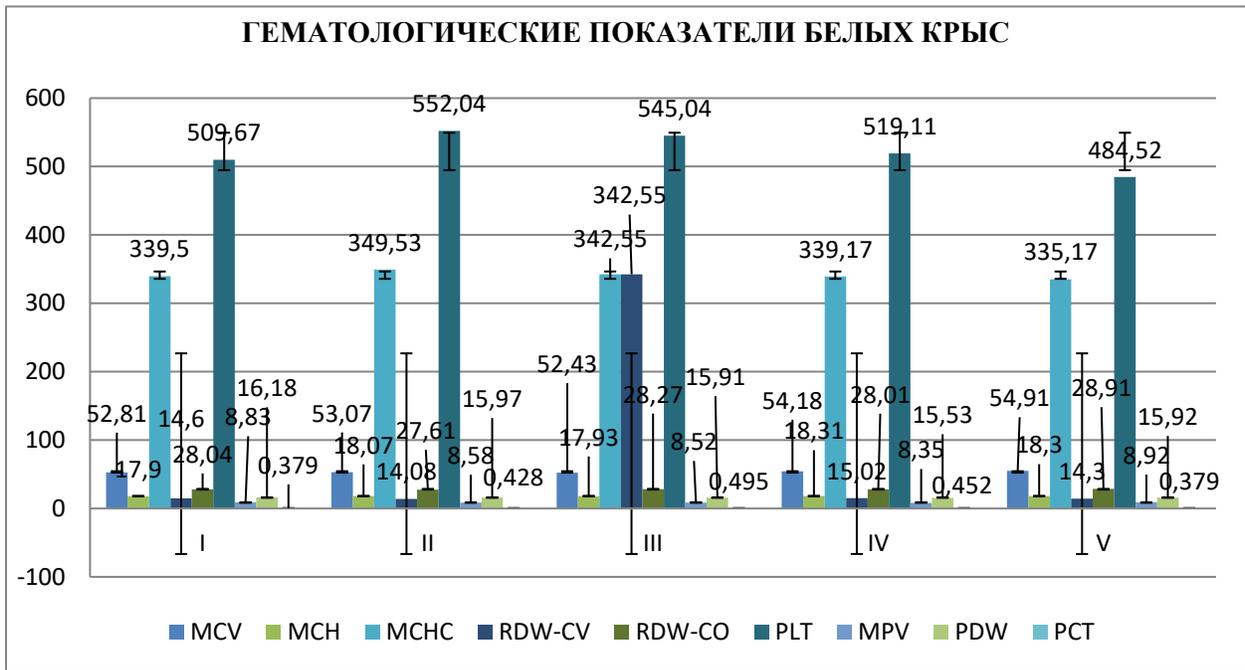


Рис. 3.2.12. Диаграмма гематологических показателей крови крыс(продолжение) (n= 5, m±m) p>0,05

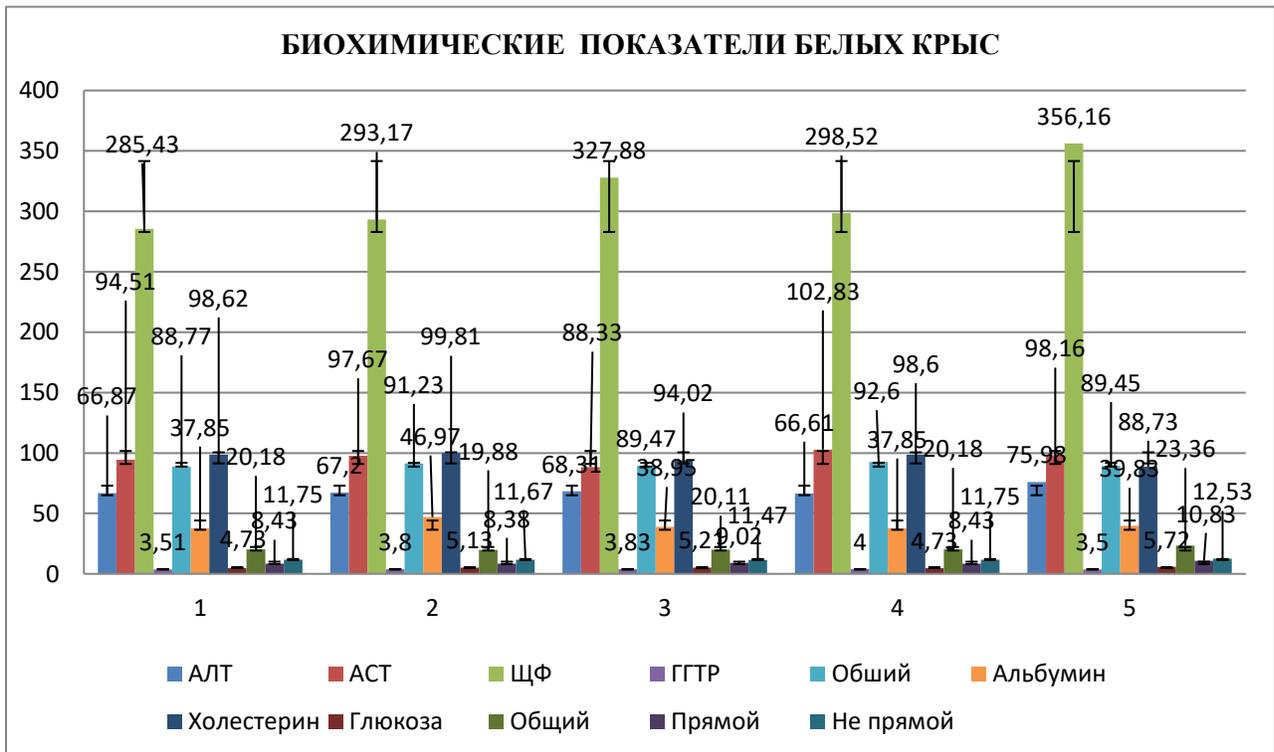


Рис.3.2.12. Диаграмма биохимических показателей крови крыс (n=5, m±m) p>0,05

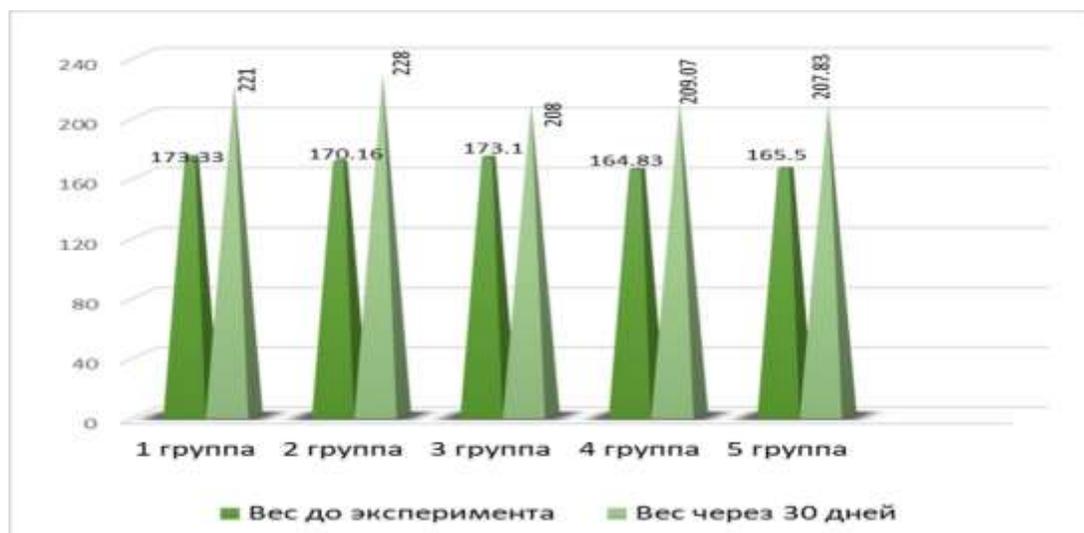


Рис.3.2.13.Динамика веса экспериментальных животных

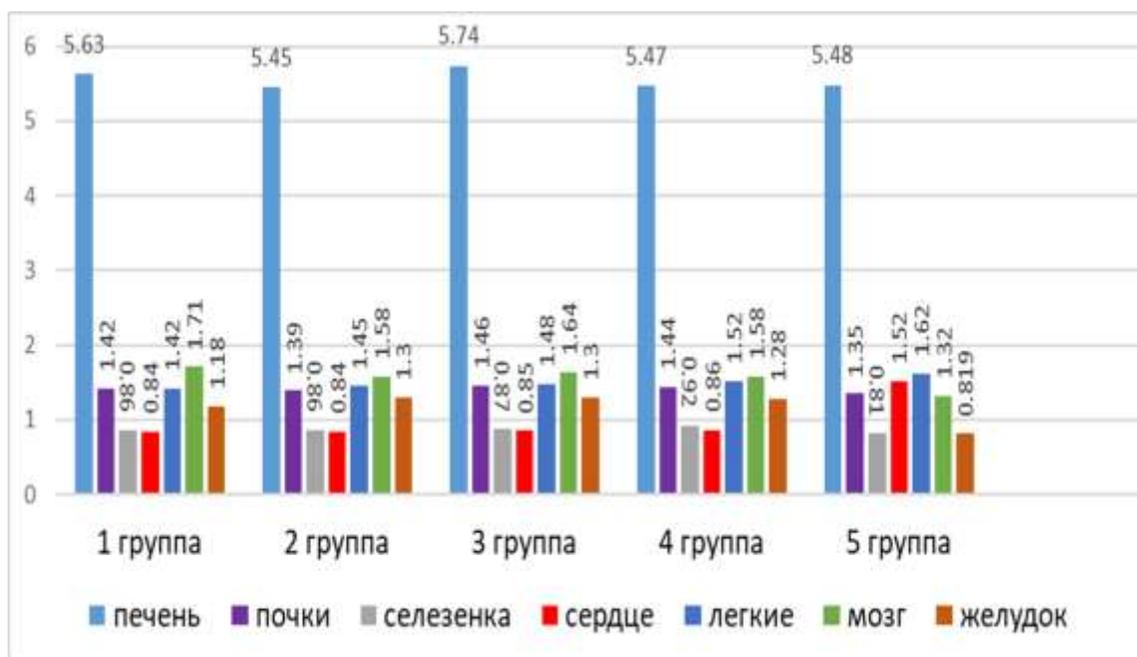


Рис.3.2.14.Динамика веса внутренних органов экспериментальных животных

Таким образом, подводя итог исследованию сыворотки крови крыс, можно заключить изучаемые показатели не определили статистически достоверных различий ($P > 0,05$) на протяжении всего срока наблюдения, что подтверждает отсутствие токсического влияния применяемых методов

клеточной терапии и тканевой инженерии. Согласно результатам гистологического анализа внутренних органов (головной мозг, селезёнка, печень, почки) на фоне проведения клеточной терапии и применения тканеинженерной конструкции, у экспериментальных животных 2-й группы, показала отсутствие признаков токсичного влияния на организм проведённого метода лечения так и без них не развивалась эндогенная интоксикация, что свидетельствует об отсутствии токсического воздействия на организм и безопасности применения клеточной терапии одновременно двух видов (тканеинженерная конструкция и инъекции фибробластов одновременно).

3.3. Результаты доклинических исследований на белых крысах

В эксперименте использовались здоровые взрослые белые беспородные крысы – самцы с исходной массой 175,83 -187,33 гр. Изучение репаративной регенерации тканеинженерной конструкции из шелковой марли и аллофибробластов, которая условно была названа ШМ+АЛ, были проведено в Ташкентском Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток на основании нормативных и методических документов Республики Узбекистан с учётом требований Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных исследований или в иных научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986 г.), а также требований Национального руководства по содержанию и использованию лабораторных животных.

Содержание животных соответствовало санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально – биологических клиник.

Кормление животных осуществлялось натуральными и брикетированными кормами, в соответствии с утверждёнными нормами. Животные предварительно прошли карантин и акклиматизацию в условиях

вивария в течение 14 дней. Каждая экспериментальная группа, включая контрольную состояла из 6 животных с учётом массы тела.

Распределение крыс на группы в зависимости от применяемого лечения: I группа шёлковая марля+фибробласты; II группа шёлковая марля + фибробласты+ дополнительные инъекции фибробластов; III группа шёлковая марля; IV группа только инъекция фибробластов; V группа дефект без лечения. Наблюдение в динамике проводилось в течение 1-х, 3-х, 5-х, 7-х, 14-ти суток.

Оценивалось общее состояние животных и клинические признаки возможной интоксикации: общее состояние животных, потребление корма и воды, изменение массы тела, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности.

Также оценивался локальный статус. Оценивали динамику и качество заживления раны в зависимости от дня наблюдения(табл.3.3.1). Измерения показали статистически более быстрое заживление в первой, второй и третьей группах, где использовалась клеточная терапия фибробластами.

Таблица 3.3.1

Динамика заращения дефекта слизистой оболочки у экспериментальных животных (процент уменьшения раны % (мм))

День № группы	3 день	5 день	7 день
I гр	63,0±3,4	83,0±2,7	100
II гр	54,0±2,6	87,0±2,8	100

III гр	39,0±3,03	69,0±3,49	94±1,8
IV гр	48,0±3,4	74±2,7	97±1,2
V гр	23±1,8	56±2,6	87,5±3,7

Также локально, мы отмечали во второй группе не только уменьшение сроков заживления по сравнению с другими группами, но и лучшее состояние местных тканей, которые по цвету, тургору не отличались от слизистой щечной области (рис.3.3.1). Таким образом, в группах где применялась клеточная терапия как в составе тканеинженерной конструкции так инъекционно (группы 1,2,4) результаты заживления в динамике и по качеству превосходит группы, где она не применялась (группы 3 и 5).

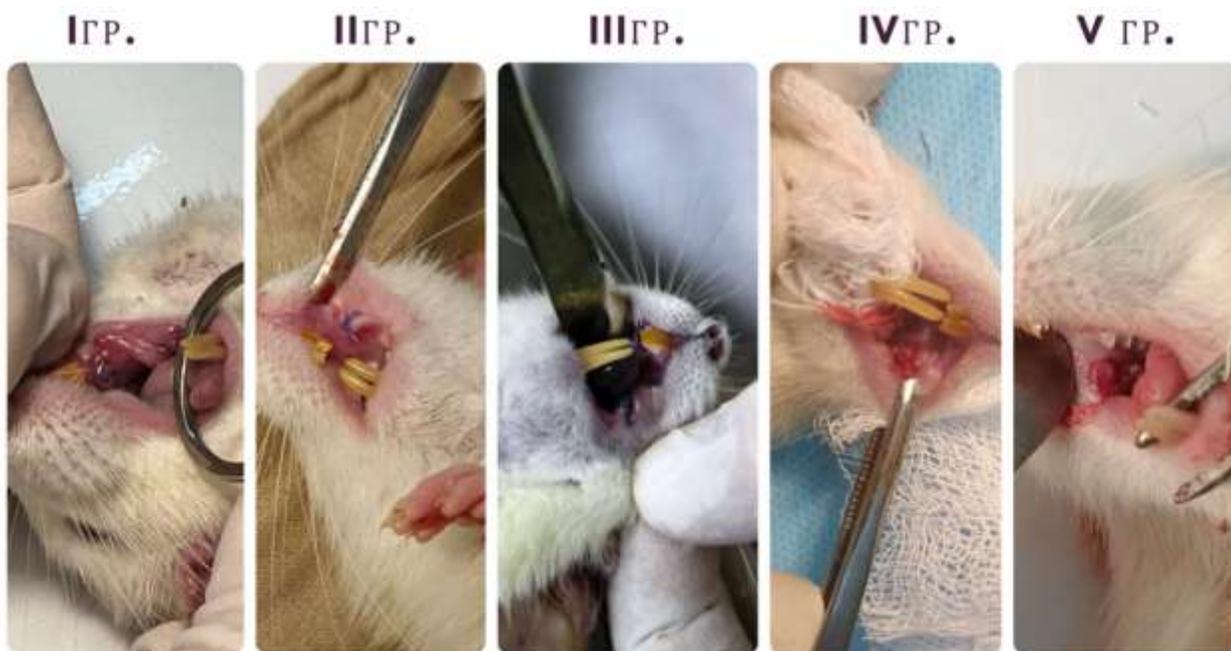


Рис.3.3.1. Динамика заживления дефекта слизистой оболочки в группах наблюдения на 7-е сутки.

В целях оценки эффективности применения тканеинженерной конструкции из шелковой отваренной марли и аутофибробластов в сочетании с инъекционным ведением аутофибробластов при дефектах слизистой полости рта проведено экспериментальное морфологическое исследование тканей был взят гистологический материал на 3 и 7 сутки.

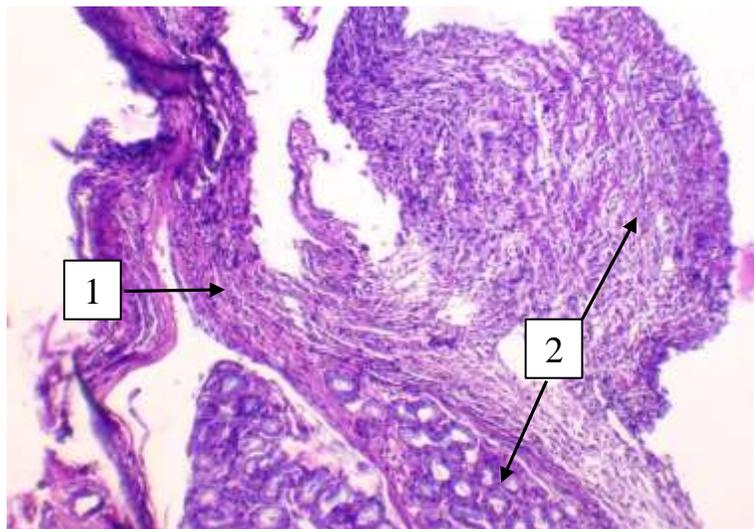


Рис.3.3.1. Прослойки зрелой волокнистой соединительной ткани-1 и дольки слюнной железы с межуточным отёком и воспалительно-клеточной инфильтрацией-2. Первая группа (ШМФ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 100.

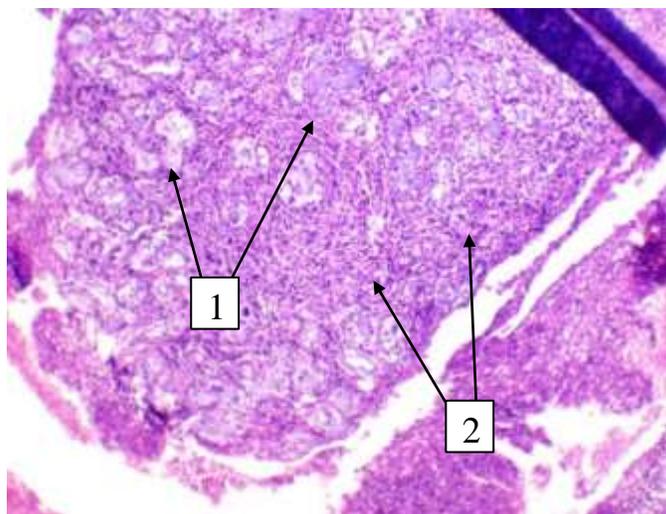


Рис.3.3.2. Мягкая ткань и долька слюнной железы с диффузной лимфоцитарной инфильтрацией-1, отёком-2. 3 день. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 40.

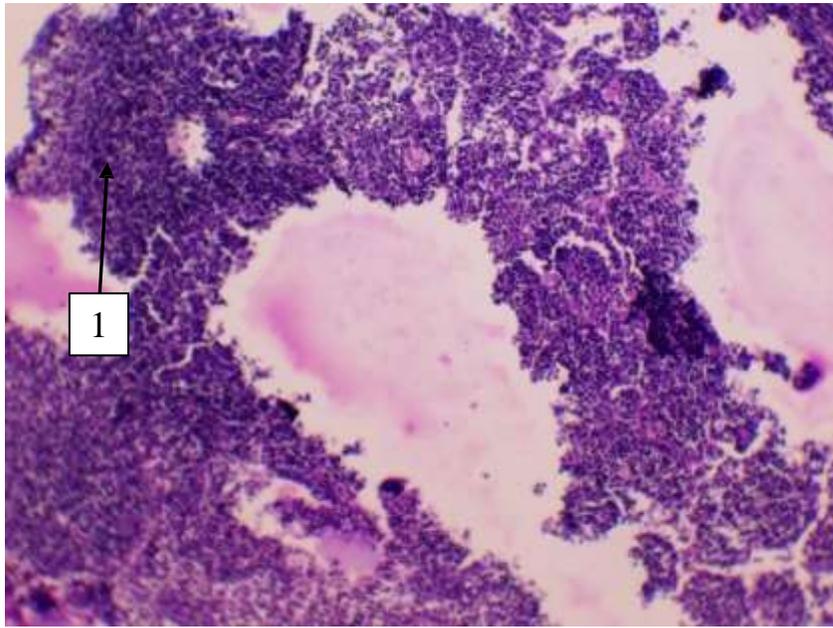


Рис.3.3.3. Под малым увеличением объектива отмечается гиперплазия лимфоидной ткани-А, пролиферация лимфоцитов. 3 день. Третья группа (ШМ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 40.

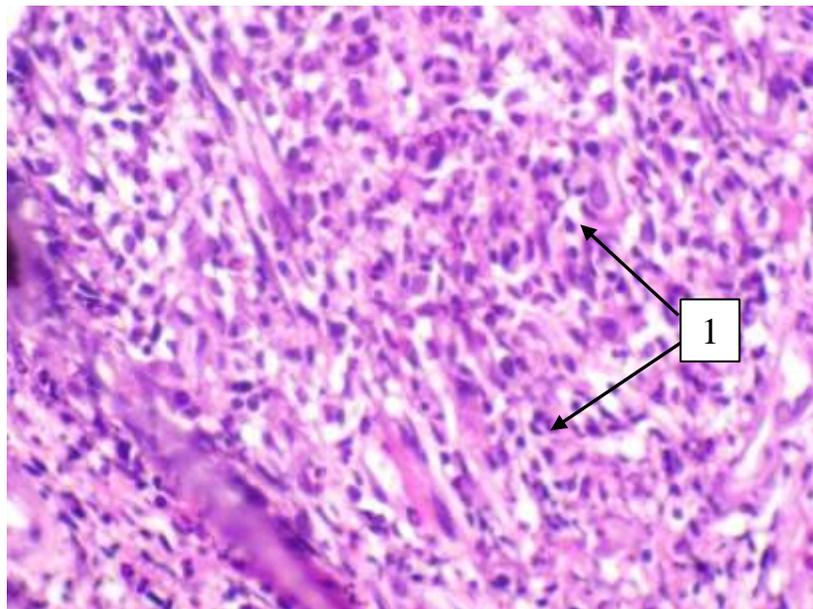


Рис.3.3.4. Под большим увеличением объектива определяется лимфоплазмоцитарная воспалительная инфильтрация-1, деструкция железистых структур. 3 день. Четвёртая группа (ФБ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 40.

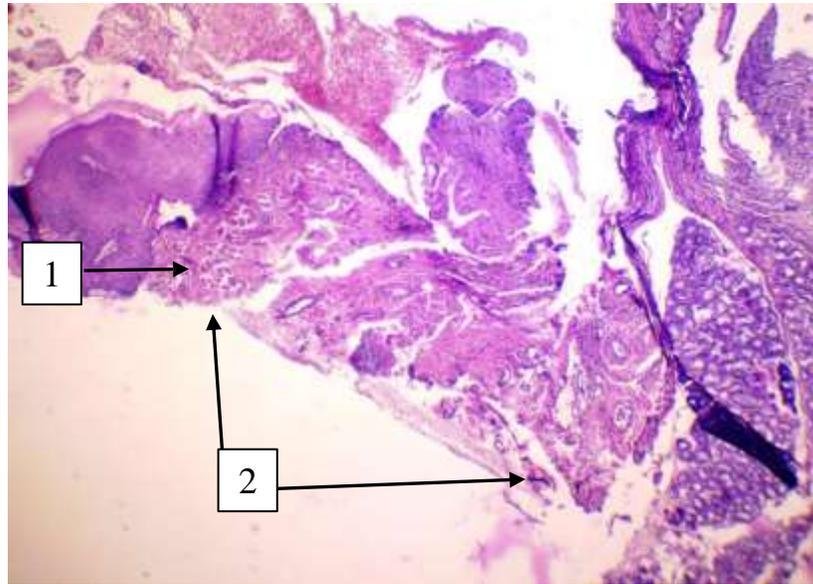


Рис 3.3.5. Мягкая ткань-1 на раневой поверхности с дефектом-2, участками распада и незначительной круглоклеточной инфильтрацией. 3 день. Пятая группа (без лечения). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 40.

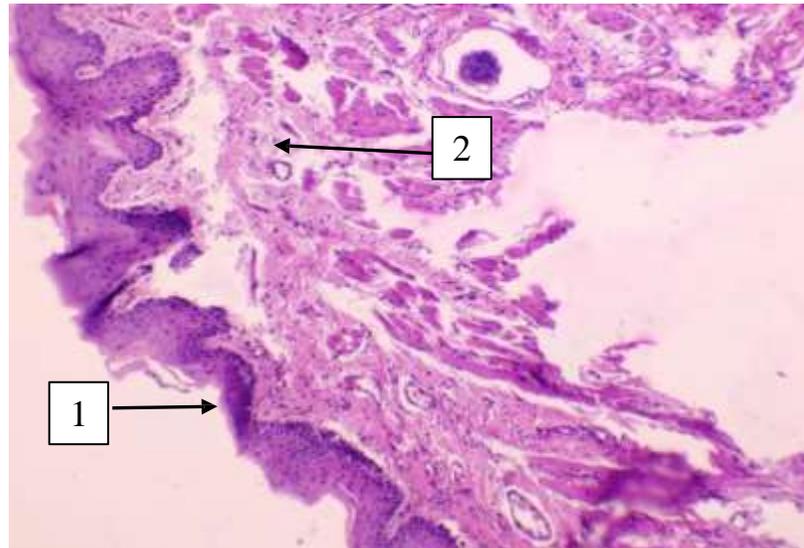


Рис.3.3.6. Покровный многослойный плоский эпителий слизистой оболочки без признаков деструкции- 1. Под эпителием в строме мелкие кровеносные сосуды и клеточные элементы грануляционной ткани-2. 7 день. Первая группа (ШМФ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 100.

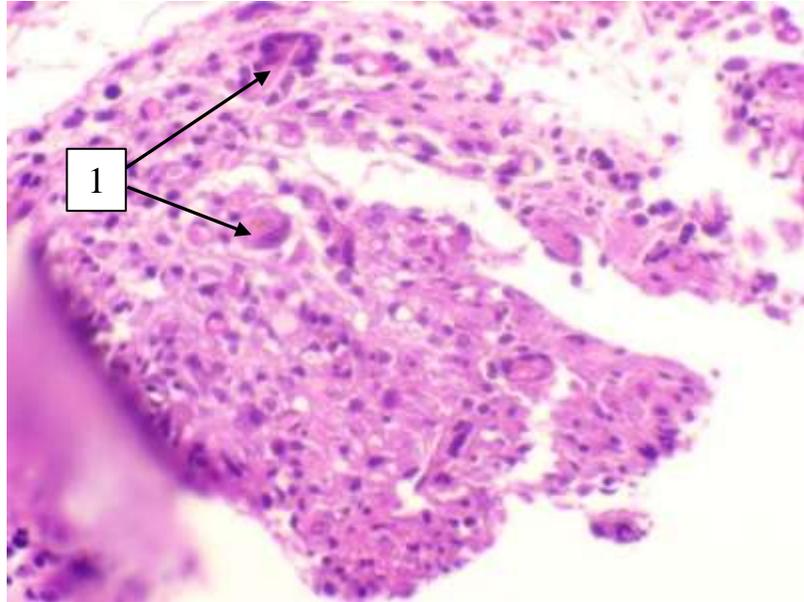


Рис.3.3.7. Мягкая ткань слизистой оболочки с обилием клеточных элементов хронического воспаления, преимущественно мононуклеарно-макрофагальной природы-1. 7 день. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 400.

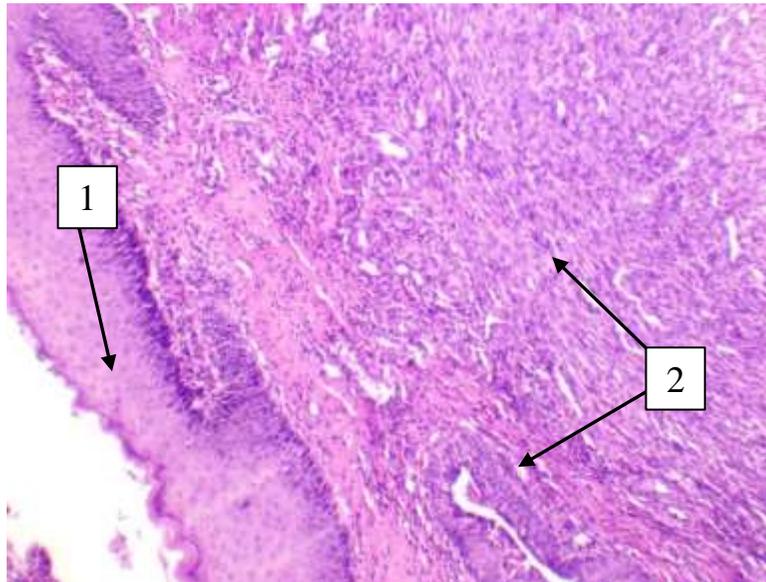


Рис.3.3.8. Покровный многослойный плоский эпителий с гиперплазией слоёв-А, подлежащая клеточно-волокнистая соединительная ткань-Б с обилием тонкостенных кровеносных сосудов.7 день. Вторая группа (ШМФ+ФБ).Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 100.

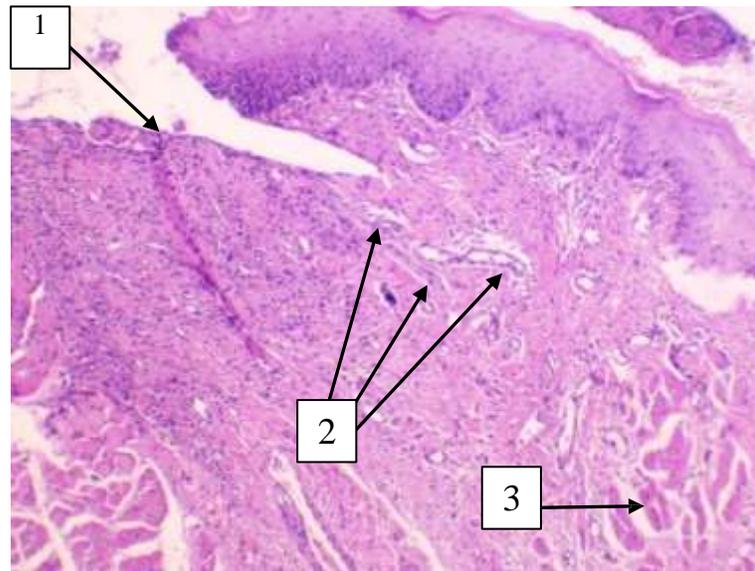


Рис.3.3.9 Покровный многослойный плоский эпителий с участком деструкции-1, под эпителием плотная волокнистая соединительная ткань, много капилляров-2, а также фрагменты мышечных волокон без признаков патологии-3. 7 день. Вторая группа (ШМФ+ФБ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 100.

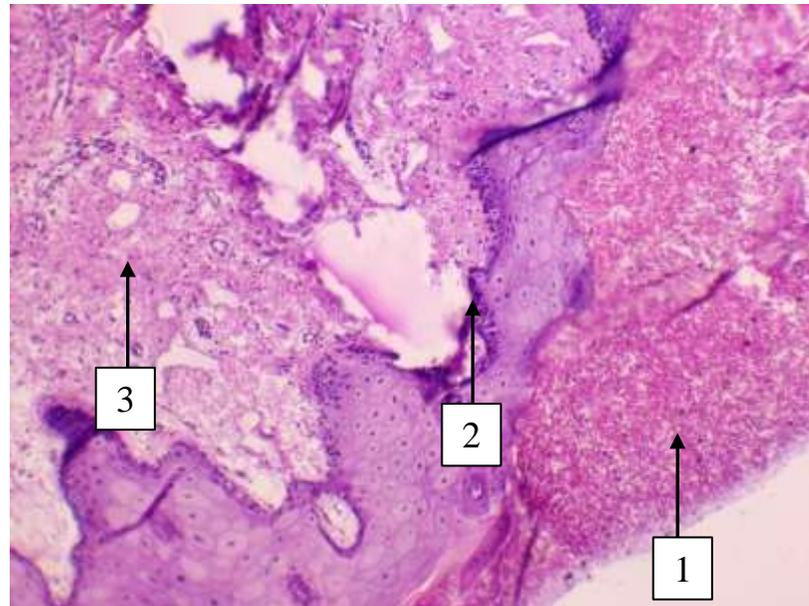


Рис.3.3.10. Скопление эритроцитов-1, фрагменты многослойного плоского эпителия-2 с участками истончения и изъязвления. Под эпителием рыхлая сеть коллагеновых волокон-3, множество мелких сосудов капиллярного типа. 7 день. Третья группа (ШМ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 100.

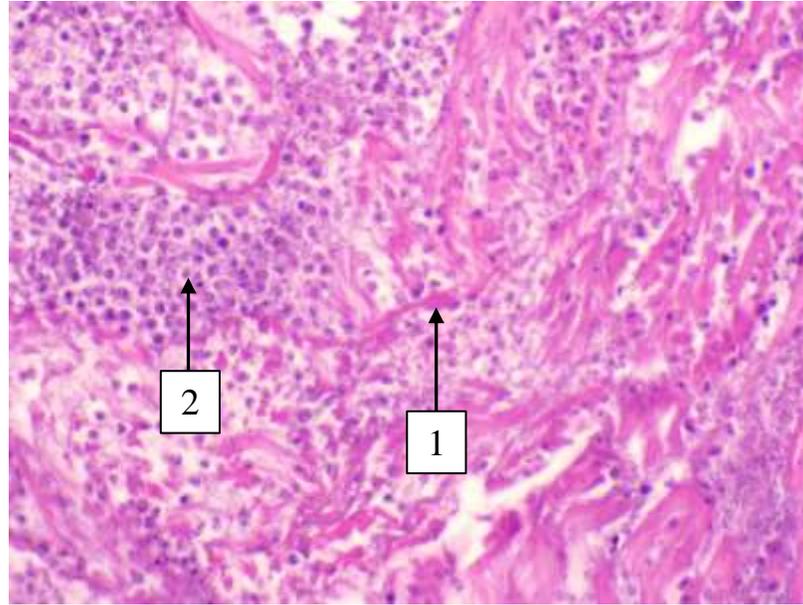


Рис.3.3.11. Среди тонких коллагеновых волокон-А очаговое скопление мононуклеаров-Б. 7 день. Четвёртая группа (ФБ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 400.

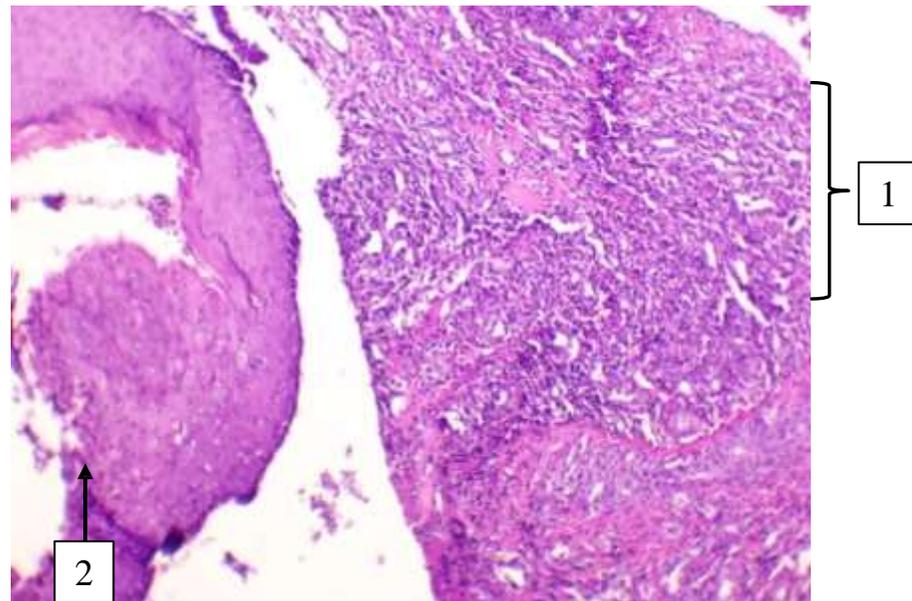


Рис.3.3.12. Пласты созревающей грануляционной ткани-1 с обилием новообразованных капилляров и фрагменты покровного эпителия-2. 7 день. Четвёртая группа (ФБ). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 100.

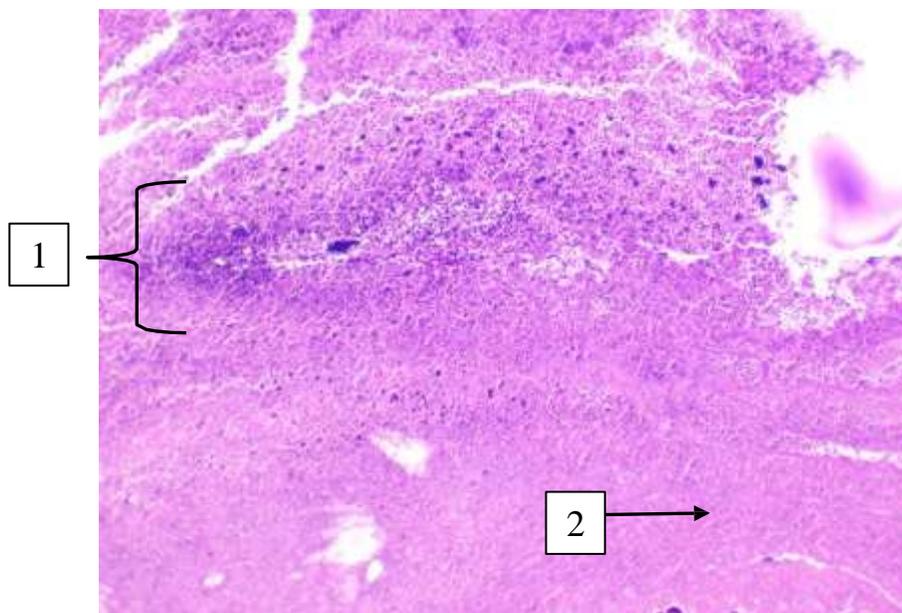


Рис. 3.3.13. Некротическая масса с примесью клеток воспаления из лейкоцитов-1, соединительная ткань-2. 7 день. Группа без лечения. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение объектива 100.

Использование клеточной терапии и тканеинженерной конструкций на основе фибробластов приводит к индукции дифференцировки эпителиоцитов и фибробластов и васкуляризации, статистически более значимой преимущественно на 3-й и 7-й день наблюдения

ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Оценка эффективности клеточной терапии аутофибробластами при дефектах полости рта

Нами были проведены клинические исследования на 12 пациентах с дефектами неба различного генеза, находившихся на амбулаторном лечении в поликлинике хирургической стоматологии Ташкентского государственного института за 2023-2025 года, возраст пациентов 35-67 лет (рис4.1.1). Возраст пациентов составил от 35 до 67 лет. Пациенты были разделены на две группы: первая основная – для закрытия послеоперационного дефекта применялась шелковая отваренная марля с аутофибробластами. Также в этой группе проводилась подготовка мягких тканей перед оперативным вмешательством путём 2-3 кратного введения от 1 до 10 миллионов клеток на глубину 2-3мм. Интервал введения составлял 1 неделю. Во второй контрольной группе проводилось только оперативное вмешательство. Культивирование аутофибробластов осуществлялось из кожи заушной области.



Рис.4.1.1. Пациенты с дефектами неба, состояние до оперативного закрытия дефекта.

Для мониторинга эффективности проводимой клеточной терапии при хирургическом лечении дефектов полости рта мы использовали критерии оценки заживления после хирургических вмешательств на тканях, окружающих зубы и имплантаты, разработанные Ганжой И.Р., Багдасаровой О.А., Ахмадиевой Е.О. (2023) (табл.4.1.1).

Таблица 4.1.1

**Оценка заживления послеоперационных ран в полости рта
(Ганжа И.Р., Багдасарова О.А., Ахмадиева Е.О., 2023)**

Критерии	Качественная характеристика	Баллы
Плотность и качество сопоставления краёв раны	полное сопоставление краёв раны	1
	частичное расхождение краёв раны	2
	полное расхождение краев раны	3
Наличие отёка	отсутствие отёка	1
	незначительный отёк	2
	обширный отёк мягких тканей	3
Экссудация	отсутствие экссудации	1
	слабая экссудация	2
	выраженная экссудация	3
Гиперемия	отсутствие гиперемии	1
	незначительная гиперемия	2
	выраженная гиперемия	3
Объём фибринозного налета	отсутствие фибринозного налета	1
	слабовыраженная полоска фибринозного налёта по линии разреза	2

	распространение фибринозного налёта на периферические мягкие ткани	3
	обильный «грязный» фибринозный налёт	4
Наличие гнойного отделяемого	отсутствие гноя	1
	небольшое гнойное отделяемое	2
	обильные гнойные выделения	3
Болевые ощущения	отсутствие боли	1
	умеренная боль	2
	выраженная боль	3

Анализ заживления раны после хирургического вмешательства проводили путём сравнения количества полученных баллов в соответствии с таблицей 4.1.1.

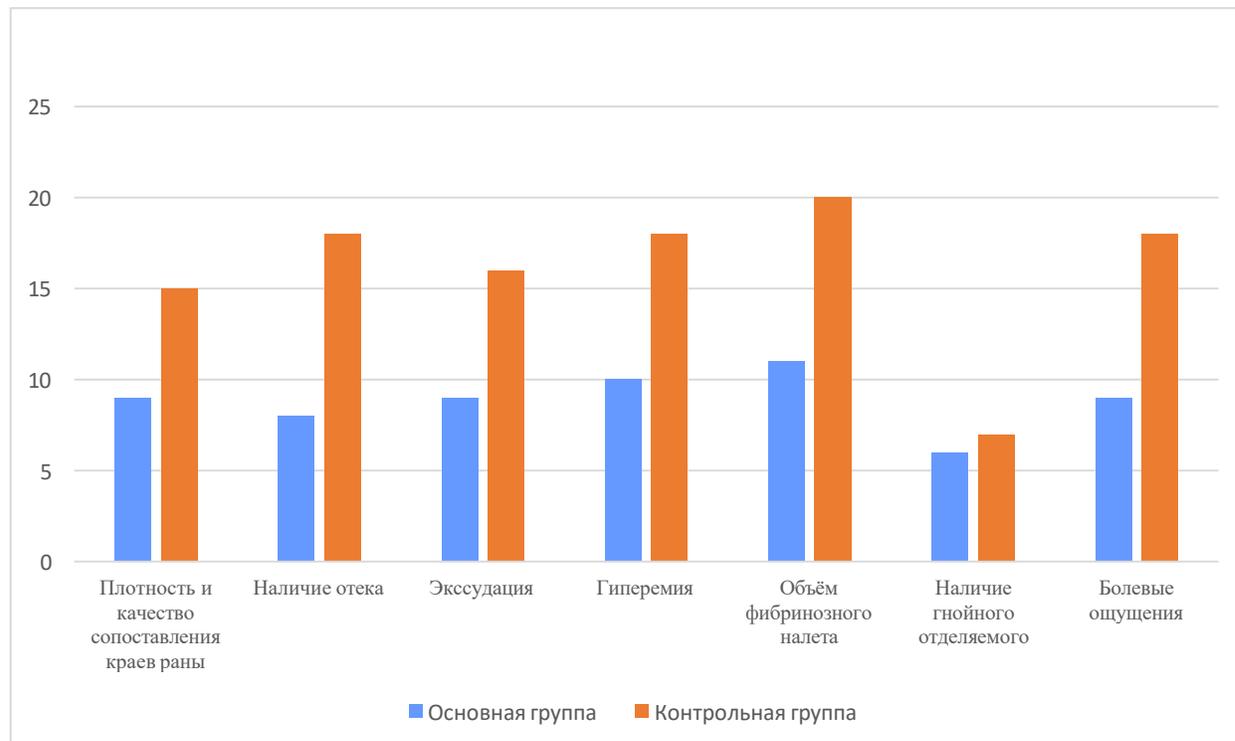


Рис.4.1.2. Заживление после хирургического вмешательств в полости рта

При клиническом наблюдении у всех пациентов первой группы, где применялось несколько курсов инъекций аутофибробластов наблюдалось улучшение состояния мягких тканей окружающих дефект в виде улучшения цвета, увеличения объёма тканей, уменьшения воспалительного процесса, за счёт образования сосудов и улучшения микроциркуляции (рис.4.1.2;4.1.3;4.1.4;4.1.5). Проведённые нами исследования подтвердили необходимость предоперационного использования аутофибробластов для повышения качества тканей, окружающих дефект, что повышает эффективность проводимых в дальнейшем реконструктивно-восстановительных операций в полости рта.



Рис.4.1.3. Состояние после закрытия дефекта нёбным лоскутом. Место взятия лоскута закрыто шелковой отваренной марлей с аутофибробластами. Основная группа.



Рис.4.1.4. Состояние после закрытия дефекта нёбным лоскутом. Место взятия лоскута закрыто йодоформной марлей с аутофибробластами. Контрольная группа.



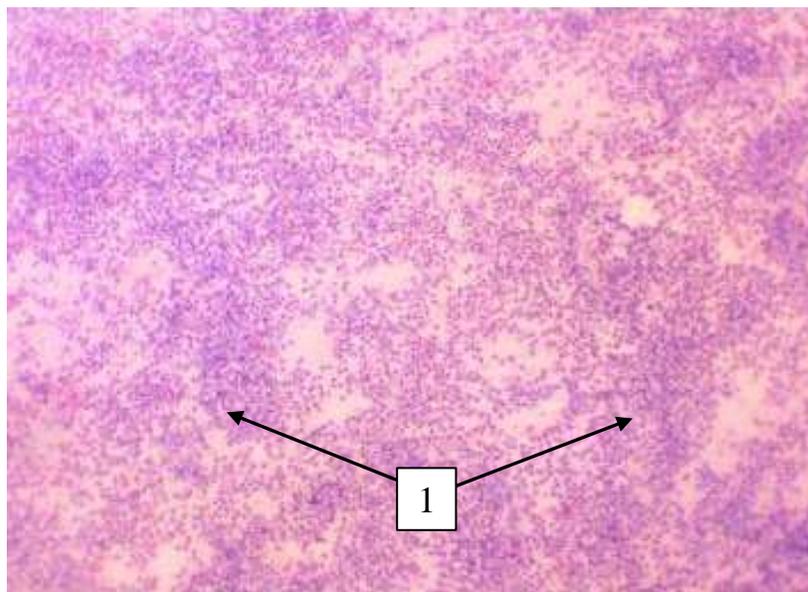
А

Б

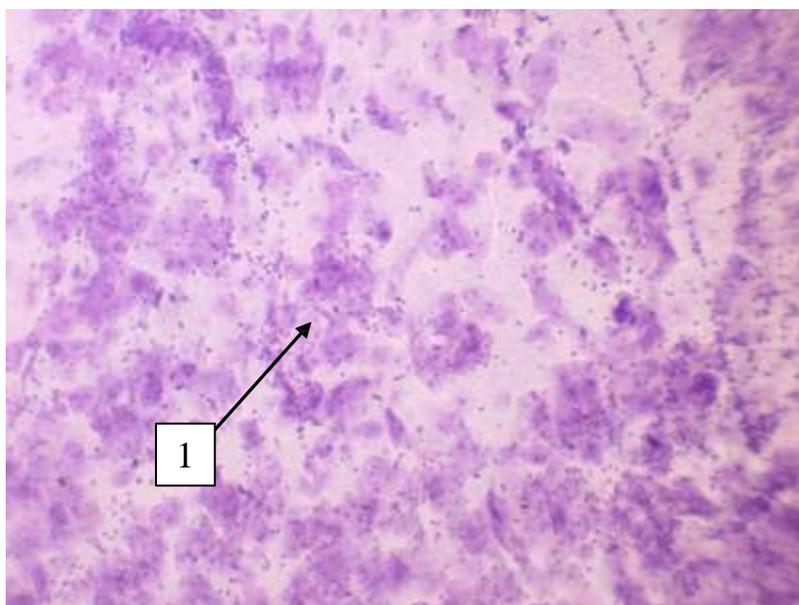
Рис.4.1.5. Состояние после операции. А-основная группа; Б-Контрольная группа.

4.2. Влияние тканеинженерной конструкции на морфологию дефекта слизистой оболочки

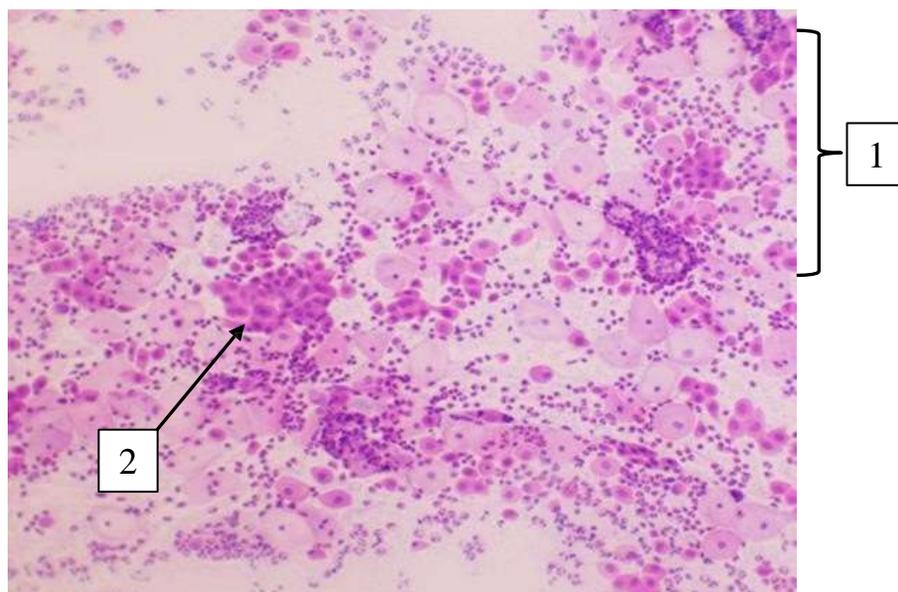
Оценку эффективности введения аутофибробластов оценивали путём сравнения мазков отпечатков в динамике. До лечения в мазках отпечатках определялась диффузная лейкоцитарная воспалительная инфильтрация, очаговое скопление лимфоцитов и гистиоцитов, клетки плоского эпителия (рис.4.2.1; 4.2.2). Цитологически в первой группе выявлено снижение воспалительной лейкоцитарной инфильтрации раны уже после первой инъекции, тогда как в контрольной группе сохраняется очаговое скопление лимфоцитов и гистиоцитов, большое количество клеток плоского эпителия. В дальнейшем после повторного введения аутофибробластов у пациентов первой в мазках слизистые массы гомогенные розового цвета белковой природы клеток воспаления и слущенных эпителиальных клеток не обнаружено (рис.4.2.3, 4.2.4).



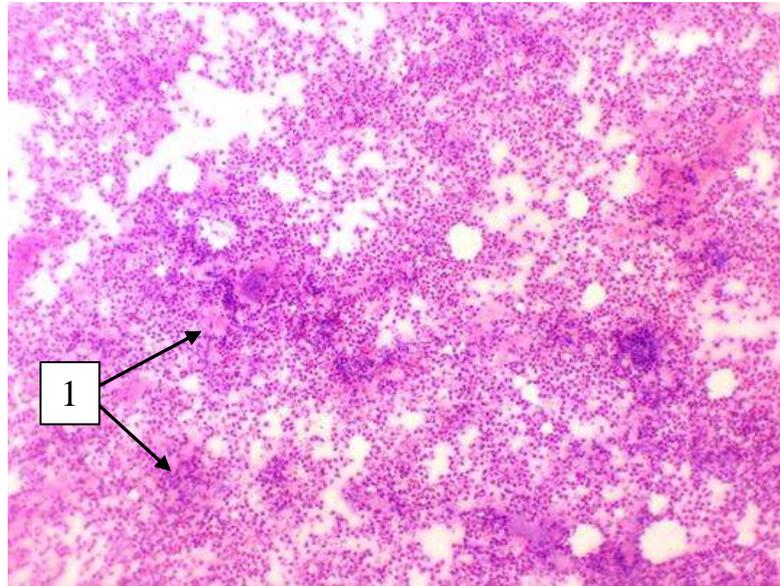
4.2.1. Диффузная нейтрофильная инфильтрация на раневой поверхности с примесью слущенных эпителиальных клеток. 3 день. Группа без лечения. Окраска гематоксилин и эозином. Увеличение объектива 40.



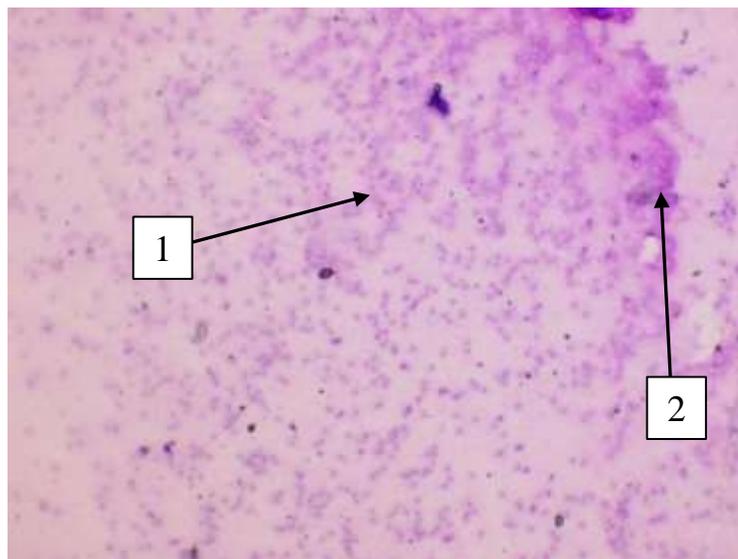
4.2.2. В мазке слущенные эпителиальные массы-1 с примесью слизи и незначительное количество лейкоцитов. 3 день. Группа с лечением. Окраска гематоксилин и эозином. Увеличение объектива 100.



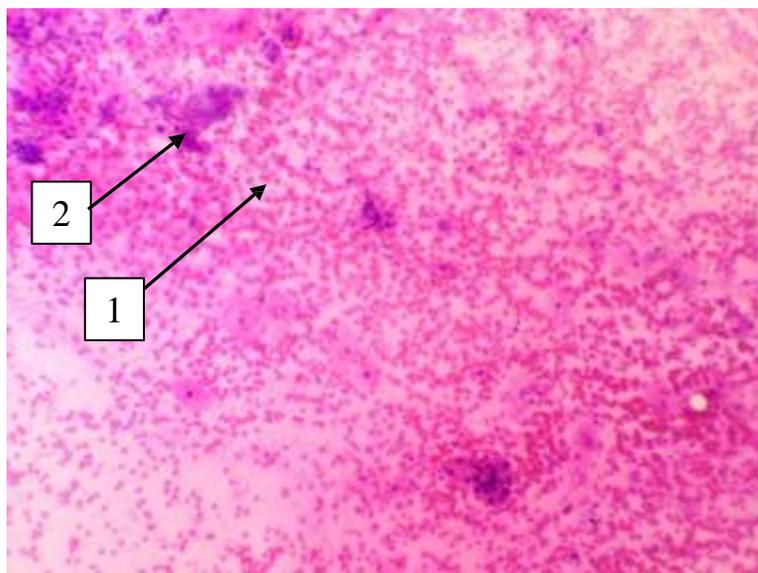
4.2.3. Незначительная нейтрофильная лейкоцитарная инфильтрация-1; клетки плоского эпителия в большом количестве-2. 5 день. Группа с лечением ШМФ +однократная инъекция аутофибробластов. Окраска гематоксилин и эозином. Увеличение объектива 100.



4.2.4. Диффузная лейкоцитарная инфильтрация-1 с примесью единичных клеток плоского эпителия. 5 день. Группа без лечения. Окраска гематоксилин и эозином. Увеличение объектива 100.



4.2.5. В поле зрения единичные лейкоциты-1, слизистая масса-2. 7 день. Группа с лечением. Окраска гематоксилин и эозином. Увеличение объектива 40.



4.2.6. Эритроциты-1, единично слущенные эпителиальные клетки-2. 7 день. Группа без лечения. Окраска гематоксилин и эозином. Увеличение объектива 100.

При анализе клеточного состава мазков отпечатков до и после применения инъекций аутофибробластов было определено, снижение количества нейтрофилов и появление зрелых фибробластов. Разработанный метод оптимизации заживления дефектов слизистой полости рта (шелковая отваренная марля с аллофибробластами и местное обкалывание аллофибробластами) может быть использован для восстановления дефектов слизистой оболочки полости рта так как способствует достоверному ускорению заживления слизистой, морфология которой не отличается от нативной слизистой оболочки полости рта.

4.3. Разработка алгоритма лечения пациентов с дефектами слизистой полости рта путём применения методов тканевой инженерии и клеточной терапии

Для оптимизации заживления дефектов полости рта после хирургического лечения нами был разработан алгоритм пред-, -интра-, -послеоперационной подготовки с использованием клеточной терапии и тканевой инженерии, который включает в себя обязательную предоперационную подготовку мягких тканей которые будут использованы для местной пластики замещения дефекта

инъекциями аутофибробластов, предварительно культивируемыми в лабораторных условиях. Во время закрытия дефекта можно использовать в качестве защитного покрытия раны или образовавшегося дефекта после взятия слизисто-надкостничного лоскута тканеинженерную конструкцию с аутофибробластами.

Алгоритм лечения дефектов полости рта с использованием методов клеточной терапии

Дооперационное ведение пациентов

1. Заготовка клеточного материала (взятие кожного лоскута под местной анестезией размером от 0,5 до 1 см с помощью устройства для панч биопсии диаметром 8 мм или с помощью скальпеля №15 или №10).

2. Необходимо поместить лоскут в транспортировочную питательную среду, провести маркировку и в течение 1-2 часов при температуре +4°C доставить в лабораторию. Также при необходимости, для изготовления аутосыворотки в день биопсии нужно взять кровь из кубитальной вены и также отправить в лабораторию.

3. Получение культивированных клеток и тканеинженерных конструкций из лаборатории осуществляется в специальном CO₂-инкубаторе. Клетки необходимо использовать в течение 2-3 часов

4. Предоперационная подготовка мягких тканей вокруг дефекта осуществляется путем инъекционного введения от 1 до 10 миллионов клеток (аутофибробластов) иглой 30 G, с интервалом введения 1 см на глубину 2-3 мм в подслизистый слой и углом наклона иглы в 45 градусов, при этом диаметр папул должен быть 2-4 мм. При необходимости курс можно повторить 2-3 раза с интервалом 7 дней в зависимости от состояния тканей.

Интраоперационное ведение пациентов

При необходимости закрытие места взятия лоскута тканеинженерной конструкцией с аутофибробластами.

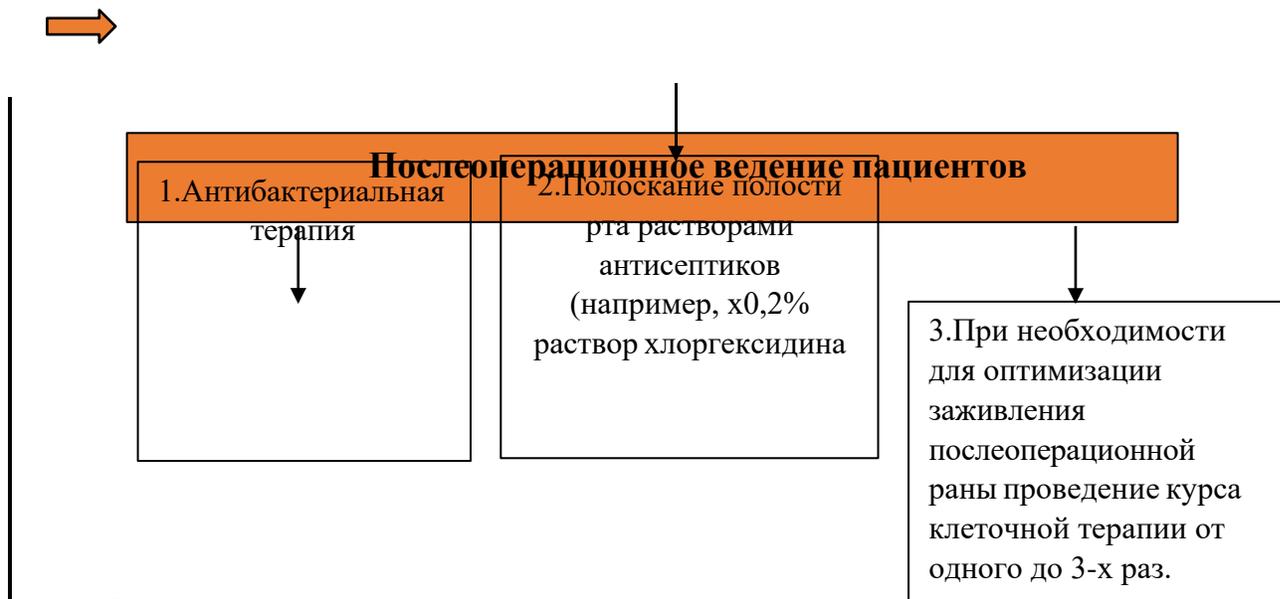


Рис.4.3.1. Алгоритм применения клеточной терапии при дефектах полости рта.

При необходимости в послеоперационном периоде, если заживление раны идёт вторичным натяжением можно использовать повторные курсы обкалывания аутофибробластами. Доза применения в предоперационном периоде составляет 2-3 курса, количество вводимых фибробластов 1 до 10 миллионов в зависимости от размера дефекта, с интервалом введения 1 см на глубину 2-3 мм в подслизистый слой и углом наклоны иглы в 45 градусов, при этом диаметр папул должен быть 2-4 мм. Курс предоперационной подготовки операционного поля инъекциями аутофибробластов должен составлять не менее 2-3 кратного введения с интервалом введения 1-2 недели. (рис.4.3.1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Соответственно Указу Президента Республики Узбекистан № УП-5590 от 7 декабря 2018 года, одной из приоритетных задач, направленных на повышение качества и доступности медицинской помощи, борьбы с инфекционными и неинфекционными заболеваниями, является развитие регенеративной медицины, в том числе, основанной на клеточных технологиях. Использование клеточной терапии актуально, однако до начала полного использования потенциала клеточных лечебных технологий существует необходимость разработки технологии получения, культивирования, способов криохранения и сохранения жизнеспособности клеток, направленной и специфичной их дифференцировки, разработки готовых к применению биомедицинских клеточных продуктов, их доклинические и клинические испытания [25,с.68;28,с.12;97;108;117,р.17;122, р.188]. Преимуществами аутологичных дермальных ФБ для клинического применения являются использование собственных клеток пациента, исключение рисков иммунного ответа на трансплантат, минимизация рисков инфицирования пациента вирусными агентами, включая ВИЧ, гепатиты и другие инфекции.

С другой стороны, в отличие от аутологичного клеточного продукта, наработка которого в достаточном терапевтическом количестве ФБ занимает порядка 6 недель, банк охарактеризованных аллогенных дермальных ФБ нарабатывается заблаговременно и клеточный продукт является готовым для экстренного применения. При наличии банка аллогенных дермальных ФБ подготовка биомедицинского клеточного продукта занимает от 3 до 5 дней. Опасения применения аллогенных биомедицинских клеточных продуктов на основе жизнеспособных дермальных ФБ связаны с возможностью сенсibilизации организма чужеродными антигенами и возможного наличия у донора тяжелых инфекционных заболеваний.

Методики культивирования дермальных фибробластов внедрены в лабораторную практику Центра передовых технологий. Морфологический

анализ первичных культур дермальных фибробластов показывает, что полученные культуры характеризуются низким уровнем гетерогенности. Большую часть клеток (до 90%) составляют фибробластоподобные клетки, в монослое имеют чёткую направленность роста и формируют многочисленные завитки [71, с.102;74, с.247;100, р.733;115, р.105;124]. В клетках хорошо различимы центрально расположенное ядро, от двух до семи ядрышек и цитоплазма с зернистостью в перинуклеарной зоне.

На сегодняшний день растёт количество БМКП, разработанных на основе клеточных технологий и уже применяемых в клинической практике. Платформой для создания БМКП являются ТИК, состоящие либо из выращенных тканей человека *in vitro* либо имплантированных клеток в носитель, определяющих характер и механизм регенерации. В качестве носителей наиболее часто используются биополимерные материалы, такие как альгинаты, коллаген, хитозан, фиброин шелка и другие биополимеры, обладающие свойствами биосовместимости и биорезорбции. Большинство коммерческих БМКП представленных на мировом рынке в качестве активного компонента содержат культивированные клетки кожи ФБ и кератиноциты, причем предпочтение отдается именно фибробластам по причине их высокой пластичности. Кроме того, обнаружено, что имплантированные дермальные ФБ оказывают непосредственное влияние на реэпителизацию и ангиогенез, что обосновывает применение данного типа клеток для устранения дефектов мягких тканей лица. В перечне БМКП на основе как аутологичных, так и аллогенных дермальных ФБ, производимых зарубежными биотехнологическими компаниями насчитывается более 15 одобренных к применению препаратов для лечения диабетических и венозных язв, хронических незаживающих ран, обширных ожоговых поражений, врожденного буллезного эпидермолиза, лечения рубцов пост-акне, алопеции по мужскому типу, потери ткани при пародонтозе. Средняя стоимость 1 см² препарата на основе ТИК сформированной из дермальных ФБ в различных вариантах биосовместимых

носителей составляет 10 евро, стоимость 1 дозы инъекционного препарата составляет 1500 долл. США.

Наличие инфраструктуры, позволяющей осуществлять разработку и локальное производство отечественных биомедицинских клеточных продуктов, позволит внедрить в медицинскую практику эффективные и безопасные инновационные биотехнологические медицинские продукты, улучшить качество лечения и обеспечить гарантированный спрос, что важно для расчета и достижения экономической эффективности отечественных инновационных БМКП.

Учитывая тот факт, что биомедицинские клеточные препараты представляют собой живые препараты и имеют короткий срок жизни, ввоз и применение зарубежных коммерческих продуктов на основе жизнеспособных клеток является крайне затруднительным. Разработка отечественных ТИК на основе жизнеспособных аутологичных дермальных ФБ в биосовместимом носителе предполагает наличие наибольшего терапевтического эффекта для пациентов, получающих безопасную клеточную терапию собственными клетками.

Клетки, культивируемые совместно с раневым покрытием «Марля медицинская шелковая отваренная» сохраняют жизнеспособность, а благодаря структуре носителя, имитирующего внеклеточный матрикс, полностью заселяют его поверхность[53,с.74;68,с.95;76,с.189;78,с.198;80,с.201].

Таким образом, раневое покрытие «Марля медицинская шелковая отваренная» обладает свойствами биосовместимости, не имеет цитотоксического эффекта и не снижает пролиферативную активность культивируемых дермальных фибробластов, что обуславливает перспективность дальнейших исследований и необходимость создания базы для разработки отечественного клеточного продукта для лечения дефектов слизистой полости рта[27,с.26;77,с.99;79,с.197;120,р.280].

Предложенная тканеинженерная конструкция обеспечивает поддержание

пролиферирующих дермальных фибробластов в носителе, что открывает совершенно новые возможности, направленные на поиск высокотехнологичных методов тканевой и клеточной инженерии и разработки биомедицинского клеточного продукта для включения в комплексную терапию ряда социально-значимых заболеваний, сопровождающихся дефектами слизистой оболочки полости рта.

ВЫВОДЫ

1. Культура аутологичных фибробластов для клеточной терапии должна соответствовать требованиям спецификации.
2. На фоне имплантации тканеинженерной конструкции как с клетками, так и без них не развивалась эндогенная интоксикация, что свидетельствует об отсутствии токсического воздействия на организм и безопасности применения данной конструкции.
3. Использование клеточной терапии и тканеинженерной конструкций на основе фибробластов приводит к индукции дифференцировки эпителиоцитов и фибробластов и васкуляризации, статистически более значимой преимущественно на 3-й и 7-й день наблюдения и является перспективным методом для стимулирования заживления и восстановления поврежденных тканей при повреждении слизистой оболочки полости рта.
4. Полученные клинико-экспериментальные данные (отсутствие эндогенной интоксикации, активация регенерации в месте повреждения, в том числе с индукцией неоангиогенеза), а также отсутствие осложнений за время наблюдения свидетельствовали об эффективности и безопасности разработанного метода лечения дефектов полости рта при помощи тканеинженерных конструкций на основе отваренной шелковой марли с аутологичными фибробластами и инъекциями аутофибробластов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная отечественная ТИК на основе жизнеспособных аутологичных дермальных ФБ в биосовместимом носителе шелковой отваренной марли предполагает наличие наибольшего терапевтического эффекта для пациентов, получающих безопасную клеточную терапию собственными клетками при дефектах полости рта.

2. Клетки, выделенные методом дезагрегации имеют ограниченное число пассажей, а пассаж лоскута позволяет получить неограниченный выход клеток за счёт пересева лоскутов. Комбинирование методов позволяет получить срочное количество жизнеспособных клеток методом дезагрегации в течение двух недель и поддерживать культуру дермальных фибробластов в течение длительного времени методом пассажа лоскута.

3. Перед введением культивированных аутологичных фибробластов пациенту при дефектах полости рта в качестве предоперационной подготовки или оптимизации заживления после хирургического вмешательства проводится орошение (полоскание) полости рта 0,05 % раствором хлоргексидина биглюконата. В области дефекта определяются точки вкола равных расстояниях в зависимости от величины дефекта, не менее 4 точек инъекций. Рекомендуемая игла 26G (0.45x13 мм). Иглу располагают перпендикулярно слизистой оболочке продвигают в ткани десны на 2 мм. Разовая доза может составить до 3 мл (содержание клеток в 1 мл не менее $1 \cdot 10^6$ клеток. Кратность введения может составить 7-10 дней.

4. При использовании тканеинженерной конструкции на основе шелковой отваренной марли и аутологичных фибробластов, рекомендована её фиксация путём наложения швов или с помощью защитной пластинки. Периодичность замены составляет 3-5 дней.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ (ALT) – аланинаминотрансфераза

АСТ (AST) – аспартатаминотрансфераза

БМКП - биомедицинский клеточный продукт

ДКМ – децеллюляризованный клеточный матрикс

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

КИК – клеточно–инженерная конструкция

КМ – костный мозг

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ППС - полная питательная среда

ТИК– тканеинженерные конструкции (tissue engineering structures)

РП – раневое покрытие

РПК – раневое покрытие на основе коллагена

РПЦ – раневое покрытие на основе производных целлюлозы

СК – стволовые клетки

СККМ – стромальные клетки костного мозга

ФБ – фибробласты

ШМ – шелковая отваренная медицинская марля

ШМФ –шелковая отваренная марля с аллофибробластами

ЩФ (ALP) – щелочная фосфатаза

ЧЛО – челюстно-лицевая область

ЕСМ – внеклеточный матрикс

EMT – эпителиально-мезенхимальный переход

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

FGF – fibroblast growth factors – фактор роста фибробластов

IGF – insulin-like growth factors – инсулиноподобный фактор роста

TGF β – transforming growth factor β – трансформирующий фактор роста β

PBS - фосфатно-солевой буферный раствор

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абидова А.Д., Цеомашко Н.Е., Арипова С.Ф. Получение компонентов для раневых покрытий и оценка их биологической активности // *Universum: Химия и биология: электрон. научн. журн.* 2019. № 11(65)
2. Агапова О. И. Сравнительный анализ трехмерной наноструктуры пористых биodeградируемых матриц из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка для регенеративной медицины / О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, М. М. Мойсенович и др. // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* – 2015. – Том XVII № 2. – С. 37–44.
3. Агапова О. И. Биоинженерные конструкции на основе фиброина шелка и спидроина для регенеративной медицины и тканевой инженерии (обзор) / О. И. Агапова // *СТМ.* – 2017. – Том 9, №2. – С. 190–206.
4. Алейник Д.Я., Зорин В.Л., Еремин И.И., Корсаков И.Н., Чарыкова И.Н., Зорин В.Л. Использование клеточных технологий для восстановления повреждений кожи при ожоговой травме // *Современные проблемы науки и образования.*–2015.–№4.;URL:<https://science-education.ru/ru/article/view?id=20750>
5. Алексеев А. А., Салахиддинов К. З., Тюрников Ю. И., Гаврилук Б. К., Селезнева И. И., Савинцева И.В. Способ лечения глубоких ран.2015-03-20 16:51:46.025000,номер патента:2385744
6. Аржиев Х. Ш. Интраоперационная пластика хирургических дефектов перегородки носа (клинико-экспериментальное исследование): диссертация ... кандидата медицинских наук: Москва, 2012.-с.24
7. Архипова А. Ю. Биорезорбируемые скаффолды на основе фиброина шелка для тканевой инженерии и регенеративной медицины: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Москва, 2016. -с.23
8. Байдик О.Д., Титаренко М.А., Сысолятин П.Г. Тканевая инженерия в стоматологии. *Стоматология.* 2015;94(2):65-68.
9. Берченко Г.Н. Влияние хитозановой губки, содержащей рекомбинантный

основной фактор роста фибробластов на заживление полнослойных ран. Применение биокомпозиционных материалов в челюстно-лицевой хирургии и стоматологии. — М., 1997. — С. 13.

10. Биниенко М. А. Использование дермального эквивалента в комплексном лечении больных с синдромом диабетической стопы: Дис. ... канд. мед.наук. — Санкт-Петербург, 2018.-с.143

11. Бозо И.Я., Деев Р.В., Пинаев Г.П. «Фибробласт» – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? Цитология 2010; 52(2): 99–109.

12. Байрейтер, К. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации / К. Байрейтер, П. Франц, Х. Родеман // Онтогенез. - 1995. - Т. 236, № 1. - С. 22-37.

13. Вахрушев И.В., Антонов Е.Н., Суббот А.М., Новиков И.А., Раева О.С.4, Ярыгин Н.В., Попов В.К., Ярыгин К.Н. Тканеинженерные конструкции для регенеративной медицины на основе мезенхимальных клеток пульпы молочного зуба и полимерных матриксов нового поколения. Курский научно- практический вестник "Человек и его здоровье". – 2017. – № 2. DOI: 10.21626/vestnik/2017-2/18. С.106-111

14. Ващенко Л.Н., Дашкова И.Р., Салатов Р.Н., Аушева Т.В., Бакулина С.М., Андрейко Е.А. К вопросу о хирургическом лечении сарком мягких тканей. – Medical Sciences. –2015. –№8. –С.234-238

15. Власов А. А. Применение коллаген-хитозановых раневых покрытий и дермального эквивалента кожи в местном лечении термических ожогов: экспериментальное исследование: автореферат дис. ... кандидата медицинских наук.-Красноярск.-2010.-25 с.

16. Вербо Е. В. Возможности применения реваскуляризированных аутотрансплантатов при пластическом устранении комбинированных дефектов лица. Автореф. дис.. д-ра мед. наук.-Мосва.-2005.- 42 с.

17. Винник Ю.С., Салмина А.Б., Дробушевская А.И., и др. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно не заживающих ран. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2011;4:2:392-397.
18. Галич С. П., Гиндич О. А., Процык В. С., Дабижа А. Ю., Огородник Я. П., Боровик Д. В. Хирургическое лечение полнослойных дефектов щёчной области. Пластична, реконструктивна і естетична хірургія • № 1–2, 2016 р.С.6-13
19. Гололобов В.Г., Дулаев А.К., Деев Р.В. и др. Новый подход к лечению дефектов длинных костей конечностей. От культур *in vivo* к культурам *in vitro*. Сборник науч. работ конф., посвящ. 80-летию со дня рождения проф. Е.А. Дыскина. — СПб., 2003, 104 – 106 с.
20. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Роль гемопоезидуцирующего микроокружения в регуляции кроветворения при цитостатических миелосупрессиях. РАМН, Институт фармакологии, Томск, 1999. - 113с.
21. Грудянов А.И., Степанова И.И., Зорин В.Л., Зорина А.И., Копнин П.Б., Черкасов В.Р. Применение аутогенных фибробластов слизистой оболочки полости рта человека для устранения рецессий десны. Стоматология. 2013;92(1):21-25.
22. Дашкова И.Р. Индивидуализация реконструктивно-пластических операций в лечении злокачественных опухолей поверхностных локализаций : Автореф. дис. канд. мед.наук. — Ростов-на-Дону, 2009. —с.44
23. Дунаевский В.А. - Пластические операции при хирургическом лечении опухолей лица и челюстей. 1976.С.190
24. Жилонов А.А. Тактика хирургического лечения обширных дефектов и деформаций челюстно-лицевой области: Дис. ... д-ра мед. наук. – Ташкент, 2002. —298 с.
25. Золотухина Е.Л. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани: современный взгляд, актуальность и перспективы применения в пластической хирургии» Исследования и практика в медицине. 2016, Т. 3, №3, С. 68-75.

26. Зорина А.И., Бозо И.Я., Зорин В.Л., Черкасов В.Р., Деев Р.В. Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения// Гены & Клетки: Том VI, №2, 2011 год, стр.: 15-26
27. Зорин В.Л., Зорина А.И., Петракова О.С., Черкасов В.Р. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи Журнал Гены и клетки. 2009;Том4 №4,С.26-40
28. Зорина А.И., Зорин В.Л., Черкасов В.Р. Дермальные фибробласты: разнообразие фенотипов, физиологических функций, возможности терапевтического применения // Косметика и медицина. – 2011; 2: 12–24. 2. Зорина А., Зорин В., Черкасов В. Дермальные фибробласты: разнообразие фенотипов и физиологических функций, роль в старении кожи // Эстетическая медицина. – 2012; 11 (1): 15–31
29. Зорин, В. Л. , Копнин П. Б., Зорина А. И., Еремин И. И., Лазарева Н. Л., Чаузова Т. С., Самчук Д. П., Петрикина А. П., Еремин П. С., Корсаков И. Н., Гринаковская О. С., Соловьева Е. В., Котенко К. В., Пулин А. А. Оптимизация условий получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека // Гены и клетки. - 2014. - Т. IX, № 2. - С. 53-60.
30. Ищенко А.И., Сулина Я.Ю., Люндуп А.В, Александров Л.С., Ищенко А.А., Горбенко О.Ю. Создание тканеинженерной конструкции с применением мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для хирургического лечения пролапса гениталий. Журнал: Российский вестник акушера-гинеколога. 2017;17(1): 21-26
31. Калакуцкий Н.В. Костная пластика нижней челюсти васкуляризированными ауто трансплантатами: Автореф. дис .. д-ра мед. наук.- Санкт-Петербург.-2004.- 58 с.
32. Кокорев О.В. Саногенетическое обоснование применения тканеинженерных конструкций на основе пористого никелида титана при патологии различного генеза.: Дис. ... д-ра мед. наук. — Томск, 2019. — 305 с.

33. Кузнецова Д. С., Тимашев П. С., Баграташвили В. Н., Загайнова Е. В. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (обзор) // Современные технологии в медицине. — 2014. — Т. 6. — № 4. — С. 201-212.
34. Кузьмичева В.И., Волова Л.Т., Гильмиярова Ф.Н., Быков И.М., Авдеева Е.В., Колотьева Н.А. Фибробласты как объект изучения пролиферативной активности *in vitro*. Наука и инновации в медицине. 2020;5(3):210-215
35. Кулова А.А., Ведяева А.П., Джериева В.Г., Текучева С.В. Применение коллагенового матрикса при устранении генерализованных рецессий десны. Стоматология. 2025;104(3):33-38.
36. Лаврищева Г.И., Горохова Г.П. Вопросы репаративной регенерации костной ткани. //Стоматология. —2003. —№3. —С.65-67.
37. Лазарев А.Ю. Хусаинов М.Р. Злокачественные опухоли орбиты, тактика хирургического лечения и оценка результатов //Поволжский онкологический сборник. — 2018. —Том 10, №4. —С.13-17
38. Локтев Н. И. Трансплантация костной ткани//Стоматология. —1997.— № 38.— С. 95—101.
39. Луговец Д.В., Фадеев Ф.А., Саркисян Н.Г., Меликян С.Г. Оценка возможности применения дермальных фибробластов для лечения дефектов тканей полости рта. Пародонтология. 2019;24(1):22-28. <https://doi.org/10.25636/PMR.1.2019.1.4>
40. Ляпичева О. В. Островковые кожно-фасциальные лоскуты на перфорантных сосудах как способ пластики дефекта кожи конечностей у онкологических больных: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Ростов н/Д., 2008.— 20 с.
41. Мелешина А.В., Быстрова А.С., Роговая О.С., Воротеляк Е.А., Васильев А.В., Загайнова Е.В. Тканеинженерные конструкты кожи и использование стволовых клеток для создания кожных эквивалентов (Обзор). Современные

технологии в медицине, том 9, №1, 2017, С. 198-220. DOI: <http://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.244>.

42. Миревич В.М., Цыренжапов А. В., Гордеева В. В., Кривошеев И. М. Способ получения средства, обладающего противовоспалительной, мочегонной и антиоксидантной активностью. 2015-03-21 17:30:55.990000, номер патента: 2542493

43. Муртазаев С.С., Храмова Н.В. Современные биотехнологии в стоматологии: Монография. - Ташкент, 2017. - 135 с.

44. Муслимов С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии. Уфа: Башкортостан, 2000. — С-9.

45. Мустафаев М.Ш. Экспериментальная апробация и клиническое применение биорезорбируемых мембран в комплексном лечении переломов костей лицевого скелета и при реконструктивных операциях.: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1998. — 37 с.

46. Нимер С. Н. Стволовые клетки (обзор литературы) // Проблемы здоровья и экологии — 2009 — № 1 — С. 46-51.

47. Неробеев, А.И. Плотникова Н.А. «Восстановительная хирургия мягких тканей челюстно-лицевой области». Москва. 1997.

48. Потеев Н.Н., Фриго Н.В., Петерсен Е.В. Искусственная кожа: виды, области применения. Клиническая дерматология и венерология. 2017;16(6):7-15.

49. Пресняков Е.В., Курбонов Х.Р., Жемков Н.И., и др. Разработка программного обеспечения на основе искусственного интеллекта для цифровой оценки репаративной регенерации костной ткани. Восстановительные биотехнологии, профилактическая, цифровая и предиктивная медицина. 2025;2(1):19-24.

50. Процык В. С. Реконструктивно-восстановительные операции в хирургии местно-распространённых злокачественных опухолей головы и шеи / В. С. Процык, О. В. Кравец, А. М. Трёмбач [и др.] // Клиническая онкология – 2016. –

№ 2. – С. 22.

51. Роговая О. С. Реконструкция эпителиальных дефектов уретры и трахеи кролика с помощью живого эквивалента кожи. Автореф. дис.. канд. биол. наук.- Мосва.-2013.- 19 с.

52. Садовой М А., Ларионов П. М., Самохин А. Г., Рожнова О. М. Клеточные матрицы (скаффолды) для целей регенерации кости: современное состояние проблемы // Хирургия позвоночника. — 2014. — № 2. — С. 79-86.

53. Сафонова Л.А., Боброва М.М., Агапова О.И., Архипова А.Ю., Гончаренко А.В., Агапов И.И. Плёнки на основе фиброина шелка для заживления полнослойной раны кожи у крыс. Вестник трансплантологии и искусственных органов / Том: 18, № 3 ,2016 С. 74-84

54. Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины. Вестник трансплантологии и искусственных органов. Том XVI № 3–2014.С. 93-108.DOI: 10.15825/1995-1191-2014-3-93-108.

55. Севастьянов В.И. Примеры экспериментально–клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине / В. И. Севастьянов, Н. В. Перова, Е. А.Немец, В. А. Сургученко, А. С. Пономарева // Биосовместимые материалы (учебное пособие).М.: МИА. – 2011. – 2 (3). – С. 237–252.

56. Слесаренко С.В., Бадюл П.А. Препланинг при реконструктивных операциях с использованием перфорантных лоскутов. Пластическая хирургия, №3(46) сентябрь'201329-36

57. Смолянинов А.Б. Клеточная медицина: концепция её развития // Клинич. патофиз. - 2004. - № 1.

58. Смолянинов А.Б., Иорданишвили А.К., Кириллов Д.А. Способ прогнозирования течения пародонтита на основе динамики количества стволовых клеток // Проблемы геронтологии и гериатрии. - 2006.

59. Сельский Н.Е. Применение биоматериалов «Аллоплант» в челюстно-лицевой хирургии. Уфа: Здравоохранение Башкортостана,2000— 15-25с.

60. Сысолятин П.Г. и др. Замещение дефектов нижней челюсти консервированной аллокостью // Стоматология. — 1976. - № 1. — С. 67-69.
61. Тиляков А.Б. Пути улучшения диагностики и лечения нестабильных переломов костей таза при сочетанной травме: Автореф. дис. канд. мед. наук. — Ташкент, 2017. — 20 с.
62. Туманов В.П., Серов Г.Г., Рунова В.П. Цитологическая характеристика культуры фибробластов человека и оптимальные условия приготовления трансплантатов для клиники //Новости клинической цитологии России. — 1997. — № 1. — С. 34—36.
63. Усманов Ф.К. Разработка и оценка эффективности биоактивного покрытия для отечественного дентального имплантата. Дис. канд. мед. наук. — Ташкент, 2018. — 93с.
64. Хватова Л.А., Сыманович О.Ю., Черношей Д.А., Лукьянов А.М. Достижения медицинской науки Беларуси. Изучение взаимодействия иммунокомпетентных клеток кожи с применением 3D модели на основе фибринового геля
65. Храмова Н.В. Оценка эффективности применения гранулированного биоситалла при полостных дефектах челюстей. Дис. ... канд. мед. наук. — Ташкент, 2007. — 111с.
66. Храмова Н.В., Амануллаев Р.А. Метод лечения поверхностных дефектов кожи путем применения клеточных технологий(экспериментальное исследование) // Universum: медицина и фармакология.-Москва,2021. -7-8(79). - С.20-21. URL: <https://7universum.com/ru/med/archive/item/12133>
67. Храмова Н.В., Амануллаев Р.А., Махмудов А.А. Оценка эффективности тканеинженерной конструкции при поверхностных дефектах кожи // Новый день в медицине. - Бухара, 2021. - №3 (35) - С. 45-50 (14.00.00; № 22)
68. Храмова Н.В., Амануллаев Р.А., Хусанова Ю.Б. Методы хирургического лечения дефектов мягких тканей лица // Stomatologiya (Среднеазиатский научно-практический журнал). - Ташкент, 2020. -№3 (80). - С.95-100

69. Храмова Н.В., Кадиров Р.Х., Махмудов А.А., Хусанова Ю.Б. Прогноз скорости заживления раны при использовании тканеинженерной конструкции с дермальными фибробластами// Свидетельство ИМА РУз об официальной регистрации программы для электронно –вычислительных машин № DGU 12352, 09.08.2021.
70. Храмова Н.В., Кодиров Р.Х., Хусанова Ю.Б., Махмудов А.А. Прогнозирование скорости заживления ран при использовании тканеинженерной конструкции с дермальными фибробластами// Журнал медицина и инновации. - Ташкент, 2021. - № 3. - С.144-149
71. Храмова Н.В., Хегай Л.Н. Варианты тканеинженерных конструкций при дефектах мягких тканей лица//Процесс обмена знаниями в условиях научно-технического прогресса: Материалы XIX Международная научно-практической конференции-конкурса «Мировое научное знание третьего тысячелетия».-31 июля 2021, Казань. С.102-104.
72. Храмова Н.В., Хегай Л.Н., Махмудов А.А. Повышение эффективности лечения глубоких дефектов мягких тканей//Общество и инновации.- Ташкент, 2021.-№6/S-С.167-173
73. Храмова Н.В., Холматова М.А., Мунгиев М.З. К вопросу использования раневых покрытий и клеточных технологий для оптимизации регенерации кожи. «Stomatologiya», Ташкент, №4, (73), 2018 год, С.57-59, DOI: 10.26739/2091- 5845-2018-1-29.
74. Храмова Н.В., Хусанова Ю.Б. Dermal fibroblasts in the treatment of skin defects// Сборник III Международной научно-практической конференции "RECENT SCIENTIFIC INVESTIGATION".-16-18 сентября, 2021, Осло, Норвегия. С.245-247
75. Храмова Н.В., Цеомашко Н.Е. Оптимизация регенерации глубоких дефектов мягких тканей на основе клеток соединительной ткани (экспериментальное исследование) / Universum: медицина и фармакология // Universum: медицина и фармакология.-Москва, 2021. -7-8(79). -С.23-26. URL:

<https://7universum.com/ru/med/archive/item/12135>

76. Хусанова Ю.Б., Храмова Н.В., Чарышникова О.С., Циферова Н.А. К вопросу технологии культивирования фибробластов// Журнал медицина и инновации. –Ташкент, 2024.-№2.-С.189-201

77. Хусанова Ю.Б. Применение клеточных технологий при лечении дефектов слизистой полости рта // Журнал медицина и инновации. – Ташкент, 2022.-№2.- С.99-105

78. Хусанова Ю.Б., Хатыпова М.Г. Возможности применения фибробластов в регенеративной медицине// Журнал медицина и инновации. – Ташкент, 2022.- №1.-С.189-198

79. Хусанова Ю.Б. Возможности клеточной терапии при дефектах слизистой оболочки полости рта // «Образование и наука- стратегическая платформа для будущего фармации».Сборник Всероссийской научно-практической конференции, Москва , 2023. - С.197-389.

80. Хусанова Ю.Б., Храмова Н.В., Чарышникова О.С., Циферова Н.А. К вопросу технологии культивирования фибробластов// Журнал медицина и инновации. –Ташкент, 2024.-№2.-С.189-201

81. Юрьевич А.А., Перова М.Д., Севостьянов И.А., Гилевич И.В. Современные возможности и перспективы замещения альвеолярных челюстных дефектов и покровных тканей полости рта: обзор литературы //Российский стоматологический журнал.- 2024; Т. 28, № 3: 271–285. DOI:10.17816/dent623472

82. Barker E, AlQobaly L, Shaikh Z, Franklin K, Thurlow J, Moghaddam B, Pratten J, Moharamzadeh K. Biological Evaluation of Oral Care Products Using 3D Tissue-Engineered In Vitro Models of Plaque-Induced Gingivitis. Dent J (Basel). 2024 May 6;12(5):126. doi: 10.3390/dj12050126. PMID: 38786524; PMCID: PMC11120139.

83. Borrelli MR, Hu MS, Longaker MT, Lorenz HP. Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Craniofacial Reconstruction and Facial Aesthetics. J Craniofac Surg. 2020 Jan/Feb;31(1):15-27. doi: 10.1097/SCS.0000000000005840.

PMID: 31369496; PMCID: PMC7155741.

84. Cao L, Su H, Si M, Xu J, Chang X, Lv J, Zhai Y. Tissue Engineering in Stomatology: A Review of Potential Approaches for Oral Disease Treatments. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 Nov 8;9:662418. doi: 10.3389/fbioe.2021.662418. PMID: 34820359; PMCID: PMC8606749.

85. Chambrone L, Botelho J, Machado V, Mascarenhas P, Mendes JJ, Avila-Ortiz G. Does the subepithelial connective tissue graft in conjunction with a coronally advanced flap remain as the gold standard therapy for the treatment of single gingival recession defects? A systematic review and network meta-analysis. *J Periodontol.* 2022;93(9):1336–1352.

86. Cruz-Gonzalez B, Johandes E, Gramm D, Hanjaya-Putra D. Bottom-up Biomaterial strategies for creating tailored stem cells in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2025 May 20;13:1581292. doi: 10.3389/fbioe.2025.1581292. PMID: 40462840; PMCID: PMC12129962.

87. De Lauretis A, Øvrebø Ø, Romandini M, Lyngstadaas SP, Rossi F, Haugen HJ. From Basic Science to Clinical Practice: A Review of Current Periodontal/Mucogingival Regenerative Biomaterials. *Adv Sci (Weinh).* 2024 May;11(17):e2308848. doi: 10.1002/advs.202308848. Epub 2024 Feb 21. PMID: 38380549; PMCID: PMC11077667.

88. España-López A, Fernández-Valadés R, Cubiles E, Garzón I, Martin-Piedra MA, Carriel V, Campos F, Martínez-Plaza A, Vallejo D, Licerias-Licerias E, Chato-Astrain J, García-García OD, Sánchez-Porras D, Ávila-Fernández P, Etayo-Escanilla M, Quijano B, Aguilar E, Campos A, Carmona G, Alaminos M. Phase I-IIa clinical trial to evaluate the safety, feasibility and efficacy of the use of a palate mucosa generated by tissue engineering for the treatment of children with cleft palate: the BIOCLEFT study protocol. *BMJ Open.* 2024 Dec 5;14(12):e093491. doi: 10.1136/bmjopen-2024-093491. PMID: 39638596; PMCID: PMC11624797.

89. Gelin A, Masson-Meyers D, Amini F, Moharamzadeh K, Tayebi L. Collagen:

The superior material for full-thickness oral mucosa tissue engineering. *J Oral Biosci.* 2024 Sep;66(3):511-518. doi: 10.1016/j.job.2024.06.006. Epub 2024 Jun 21. PMID: 38909983.

90. He Q, Feng T, Xie Y, Swamiappan S, Zhou Y, Zhou Y, Zhou H, Peng X. Recent Advances in the Development and Application of Cell-Loaded Collagen Scaffolds. *Int J Mol Sci.* 2025 Apr 24;26(9):4009. doi: 10.3390/ijms26094009. PMID: 40362249; PMCID: PMC12071569.

91. Izumi K, Yortchan W, Aizawa Y, Kobayashi R, Hoshikawa E, Ling Y, Suzuki A. Recent trends and perspectives in reconstruction and regeneration of intra/extra-oral wounds using tissue-engineered oral mucosa equivalents. *Jpn Dent Sci Rev.* 2023 Dec;59:365-374. doi: 10.1016/j.jdsr.2023.10.002. Epub 2023 Oct 25. PMID: 37954029; PMCID: PMC10632115.

92. Jimbo R, Singer J, Tovar N, Marin C, Neiva R, Bonfante EA, Janal MN, Contamin H, Coelho PG. Regeneration of the cementum and periodontal ligament using local BDNF delivery in class II furcation defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018 May;106(4):1611-1617. doi: 10.1002/jbm.b.33977. Epub 2017 Aug 21. PMID: 28834247.

93. Ju Y, Hu Y, Yang P, Xie X, Fang B. Extracellular vesicle-loaded hydrogels for tissue repair and regeneration. *Mater Today Bio.* 2022 Dec 21;18:100522. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100522. PMID: 36593913; PMCID: PMC9803958.

94. Khusanova Yu.B., Khramova N.V., Charyshnikova O.S., Tsiferova N.A. Assessment of the effect of connective tissue cells on the regeneration of the oral mucosa // *Central Asian Journal of Medicine* 2025 №4 p. 193-196. eISSN 2181-1326

95. Khusanova Yu.B. Prospects of using cell therapy based on connective tissue cells to treat oral mucosa defects // *Scientific research of the SCO countries: synergy and integration.* Beijing, China 2025. -p.92-96.

96. Kong X, Fu J, Shao K, Wang L, Lan X, Shi J. Biomimetic hydrogel for rapid and scar-free healing of skin wounds inspired by the healing process of oral mucosa. *Acta*

Biomater. 2019 Dec;100:255-269. doi: 10.1016/j.actbio.2019.10.011. Epub 2019 Oct 10. PMID: 31606531.

97. Laugisch O, Cosgarea R, Nikou G, Nikolidakis D, Donos N, Salvi GE, Stavropoulos A, Jepsen S, Sculean A. Histologic evidence of periodontal regeneration in furcation defects: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2019 Jul;23(7):2861-2906. doi: 10.1007/s00784-019-02964-3. Epub 2019 Jun 4. PMID: 31165313.

98. Liu T, Xu J, Pan X, Ding Z, Xie H, Wang X, Xie H. Advances of adipose-derived mesenchymal stem cells-based biomaterial scaffolds for oral and maxillofacial tissue engineering. *Bioact Mater*. 2021 Jan 30;6(8):2467-2478. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.01.015. PMID: 33553828; PMCID: PMC7850942.

99. Lopez-Letayf S, Arie I, Araidy S, Abu El-Naaj I, Pitaru S, Arzate H. Human oral mucosa-derived neural crest-like stem cells differentiate into functional osteoprogenitors that contribute to regeneration of critical size calvaria defects. *J Periodontol Res*. 2022 Apr;57(2):305-315. doi: 10.1111/jre.12960. Epub 2021 Nov 28. PMID: 34839539.

100. Masaeli R, Zandsalimi K, Lotfi Z, Tayebi L. Using Enamel Matrix Derivative to Improve Treatment Efficacy in Periodontal Furcation Defects. *J Prosthodont*. 2018 Oct;27(8):733-736. doi: 10.1111/jopr.12753. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29322600.

101. Masson-Meyers DS, Bertassoni LE, Tayebi L. Oral mucosa equivalents, prevascularization approaches, and potential applications. *Connect Tissue Res*. 2022 Sep;63(5):514-529. doi: 10.1080/03008207.2022.2035375. Epub 2022 Feb 8. PMID: 35132918; PMCID: PMC9357199.

102. Masson-Meyers DS, Tabatabaei F, Steinhaus L, Toth JM, Tayebi L. Development of fibroblast/endothelial cell-seeded collagen scaffolds for in vitro prevascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2023 Mar;111(3):633-645. doi: 10.1002/jbm.b.35182. Epub 2022 Oct 19. PMID: 36262080; PMCID: PMC10585651.

103. Maticescu A, Ardelean LC, Rusu LC, Craciun D, Bratu EA, Babucea M,

- Leretter M. Advanced Biomaterials and Techniques for Oral Tissue Engineering and Regeneration-A Review. *Materials* (Basel). 2020 Nov 23;13(22):5303. doi: 10.3390/ma13225303. PMID: 33238625; PMCID: PMC7700200.
104. Miguel MMV, Mathias-Santamaria IF, Rossato A, et al. Microcurrent electrotherapy improves palatal wound healing: Randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2021;92(2):244–253.
105. Op 't Veld RC, Walboomers XF, Jansen JA, Wagener FADTG. Design Considerations for Hydrogel Wound Dressings: Strategic and Molecular Advances. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020 Jun;26(3):230-248. doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0281. Epub 2020 Feb 28. PMID: 31928151.
106. Park S, Kim K, Bae IH, et al. TIMP3 is a CLOCK–dependent diurnal gene that inhibits the expression of UVB–induced inflammatory cytokines in human keratinocytes. *The FASEB Journal*.2018;32(3):1510-1523
107. Peters K, Wiesmann N, Heimes D, Schwab R, Kämmerer PW, Al-Nawas B, Unger RE, Hasenburg A, Brenner W. Extracorporeal Shock Wave Therapy Improves In Vitro Formation of Multilayered Epithelium of Oral Mucosa Equivalents. *Biomedicines*. 2022 Mar 18;10(3):700. doi: 10.3390/biomedicines10030700. PMID: 35327502; PMCID: PMC8945876.
108. Qi Z, Yan Z, Tan G, Jia T, Geng Y, Shao H, Kundu SC, Lu S. Silk Fibroin Microneedles for Transdermal Drug Delivery: Where Do We Stand and How Far Can We Proceed? *Pharmaceutics*. 2023 Jan 20;15(2):355. doi: 10.3390/pharmaceutics15020355. PMID: 36839676; PMCID: PMC9964088.
109. Ramos-Ibeas P, Barandalla M, Colleoni S, Lazzari G. Pyruvate antioxidant roles in human fibroblasts and embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017;429(1-2):137-150
110. Rodin VV, Belton PS. Changes in Natural Silk Fibres by Hydration, Tensile Loading and Heating as Studied by ¹H NMR: Anisotropy in NMR Relaxation Times. *Polymers* (Basel). 2022 Sep 3;14(17):3665. doi: 10.3390/polym14173665. PMID:

36080741; PMCID: PMC9460615.

111. Roh JL, Lee J, Jang H, Kim EH, Shin D. Use of oral mucosal cell sheets for accelerated oral surgical wound healing. *Head Neck*. 2018 Feb;40(2):394-401. doi: 10.1002/hed.24968. Epub 2017 Oct 9. PMID: 28990282.

112. Santamaria MP, Mathias-Santamaria IF, Ferreira Bonafé AC, Gonzalez OA, Kirakodu S, Monteiro MF, Casarin RCV, Shaddox LM, Miguel MMV. Microbiome and Inflammatory Biomarkers Associated With Palatal Wound Healing. *J Periodontal Res*. 2025 Jul;60(7):664-675. doi: 10.1111/jre.13373. Epub 2025 Jan 13. PMID: 39801488; PMCID: PMC12255821.

113. Schwab R, Heller M, Pfeifer C, Unger RE, Walenta S, Nezi-Cahn S, Al-Nawas B, Hasenburg A, Brenner W. Full-thickness tissue engineered oral mucosa for genitourinary reconstruction: A comparison of different collagen-based biodegradable membranes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021 Apr;109(4):572-583. doi: 10.1002/jbm.b.34724. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32914546.

114. Sun Q, Li Y, Luo P, He H. Animal models for testing biomaterials in periodontal regeneration. *Biomater Transl*. 2023 Sep 28;4(3):142-150. doi: 10.12336/biomatertransl.2023.03.003. PMID: 38283090; PMCID: PMC10817781.

115. Tang J, Han Y, Zhang F, Ge Z, Liu X, Lu Q. Buccal mucosa repair with electrospun silk fibroin matrix in a rat model. *Int J Artif Organs*. 2015 Feb;38(2):105-12. doi: 10.5301/ijao.5000392. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25744194.

116. Tella EA, Aldahlawi SA, Azab ET, Yaghmoor WE, Fansa HA. Evaluation of hyaluronic acid gel with or without acellular dermal matrix allograft in the treatment of class II furcation defects in dogs: A histologic and histomorphometric study. *Saudi Dent J*. 2023 Nov;35(7):845-853. doi: 10.1016/j.sdentj.2023.07.007. Epub 2023 Jul 6. PMID: 38025597; PMCID: PMC10658385.

117. Toma AI, Fuller JM, Willett NJ, Goudy SL. Oral wound healing models and emerging regenerative therapies. *Transl Res*. 2021 Oct;236:17-34. doi: 10.1016/j.trsl.2021.06.003. Epub 2021 Jun 20. PMID: 34161876; PMCID:

PMC8380729.

118. Ullah S, Zainol I. Fabrication and applications of biofunctional collagen biomaterials in tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2025 Apr;298:139952. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.139952. Epub 2025 Jan 15. PMID: 39824

119. 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 Aug 6;11(8):1165. doi: 10.3390/biom11081165. PMID: 34439831; PMCID: PMC8394648.

120. Wang D, Liu H, Fan Y. Silk fibroin for vascular regeneration. *Microsc Res Tech*. 2017 Mar;80(3):280-290. doi: 10.1002/jemt.22532. Epub 2015 Jun 12. PMID: 26097014.

121. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism*. 2016;23(2):303-314

122. Xie M, Xu Y, Song L, Wang J, Lv X, Zhang Y. Tissue-engineered buccal mucosa using silk fibroin matrices for urethral reconstruction in a canine model. *J Surg Res*. 2014 May 1;188(1):1-7. doi: 10.1016/j.jss.2013.11.1102. Epub 2013 Dec 6. Erratum in: *J Surg Res*. 2024 Jan;293:578-579. doi: 10.1016/j.jss.2023.09.048. PMID: 24411303.

123. Yuan H, Chlipala GE, Bangash HI, Meenakshi R, Chen D, Trivedi HM, DiPietro LA, Gajendrareddy P, Chen L. Dynamics of Human Palatal Wound Healing and the Associated Microbiome. *J Dent Res*. 2025 Jan;104(1):97-105. doi: 10.1177/00220345241288761. Epub 2024 Dec 4. PMID: 39629949; PMCID: PMC11667194.

124. Zhang W, Chen L, Chen J, Wang L, Gui X, Ran J, Xu G, Zhao H, Zeng M, Ji J, Qian L, Zhou J, Ouyang H, Zou X. Silk Fibroin Biomaterial Shows Safe and Effective Wound Healing in Animal Models and a Randomized Controlled Clinical Trial. *Adv Healthc Mater*. 2017 May;6(10). doi: 10.1002/adhm.201700121. Epub 2017 Mar 24. PMID: 28337854.