

# Сравнительный анализ роста условно-патогенных микроорганизмов полости рта на поверхности коллагеновых мембран: экспериментальное исследование

О.А. Свитич<sup>1,2</sup>, А.В. Поддубиков<sup>1</sup>, П.С. Тимашев<sup>2,3</sup>, Е.Ю. Дьячкова<sup>2</sup>, М.С. Гостев<sup>2</sup>, Н.О. Вартанова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup>Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

**Актуальность.** На сегодняшний день в хирургической стоматологии остается актуальным вопрос повышения эффективности применения коллагеновых мембран в полости рта в условиях потенциальной микробной контаминации раны.

**Цель исследования.** Провести сравнительный анализ роста условно-патогенных бактерий полости рта на различных коллагеновых мембранах.

**Материалы и методы.** На базе ФГБНУ НИИВС имени И. И. Мечникова был проведен сравнительный анализ роста условно-патогенных бактерий полости рта на поверхности деградируемых коллагеновых мембран, разработанных в Институте регенеративной медицины Сеченовского Университета, и уже существующего зарубежного аналога. Оценку микробного роста проводили для *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* и *Candida albicans* как наиболее клинически значимых микроорганизмов, выделяемых из полости рта. Анализ количественного состава микроорганизмов проводили как для контрольной группы без мембран, так и в группах с мембранами (группа 2 – персонализированная коллагеновая мембрана 2, группа 3 – мембрана 3 с человеческим рекомбинантным лактоферрином, группа 4 – мембрана Mucograft) на 3, 5 и 7 сутки от начала колонизации поверхности мембран. Также проводили оценку изменения pH 10% раствора сахарозы под влиянием микроорганизмов биопленки во всех группах. Статистическая обработка данных включала в себя расчет средних, стандартных отклонений и медиан, сравнение между группами проводили с помощью критерия Краскелла – Уоллиса после оценки нормальности распределения выборок. Статистически значимыми результаты считали при достоверности не менее 95%.

**Результаты.** Проведенный анализ показал статистически значимые различия для количественного состава микробной биопленки на поверхности всех трех мембран. Наилучшим результатом на всех сроках обладала разработанная коллагеновая мембрана с лактоферрином, тогда как персонализированная коллагеновая мембрана по значению КОЕ и изменению pH среды не значимо отличалась от мембраны Mucograft. Данное положение было статистически значимым для всех трех изучаемых микроорганизмов.

**Заключение.** Проведенное исследование показало потенциальную возможность использования разработанных коллагеновых мембран для устранения дефектов мягких тканей в полости рта в условиях потенциальной контаминации их поверхности в качестве альтернативы зарубежным аналогам.

**Ключевые слова:** коллагеновая мембрана, полость рта, микробная контаминация, дефект слизистой полости рта.

**Для цитирования:** Свитич ОА, Поддубиков АВ, Тимашев ПС, Дьячкова ЕЮ, Гостев МС, Вартанова НО. Сравнительный анализ роста условно-патогенных микроорганизмов полости рта на поверхности коллагеновых мембран: экспериментальное исследование. *Пародонтология*. 2023;28(4):337-346. <https://doi.org/10.33925/1683-3759-2023-804>.

## Comparative analysis of the oral opportunistic microorganism growth on the surface of collagen membranes: experimental study

O.A. Svitich<sup>1,2</sup>, A.V. Poddubikov<sup>1</sup>, P.S. Timashev<sup>2,3</sup>, E.Yu. Diachkova<sup>2</sup>,  
M.S. Gostev<sup>2</sup>, N.O. Vartanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup>Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

## ABSTRACT

**Relevance.** Nowadays, in oral surgery, it is still relevant to increase the effectiveness of collagen membranes in the oral cavity in the condition of potential microbial contamination of the wound.

**Purpose.** The study aimed to conduct a comparative analysis of the growth of opportunistic oral bacteria on various collagen membranes.

**Material and methods.** Based on the I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, the study conducted a comparative analysis of the growth of opportunistic oral bacteria on the surface of resorbable collagen membranes developed by the Institute of Regenerative Medicine of the Sechenov University and an already existing foreign alternative. Microbial growth was assessed for *S. aureus*, *S. mutans* and *C. albicans* as the most significant microorganisms isolated from the oral cavity. The quantitative composition of microorganisms was analyzed in the control group without membranes and in groups with membranes (Group 2 – customized collagen membrane 2, Group 3 – membrane 3 with recombinant human lactoferrin, Group 4 – Mucograft membrane) on days 3, 5, and 7 from the start of membrane surface colonization. In all groups, we also evaluated the pH change in a 10% sucrose solution under the influence of biofilm microorganisms. Statistical data processing included the calculation of mean, standard deviations and medians, and comparison between groups was carried out using the Kruskal-Wallis test after assessing the samples' distribution normality. The results were statistically significant at a minimum of 95%.

**Results.** The performed analysis showed statistically significant differences in the quantitative composition of the microbial biofilm on the surface of all three membranes. The developed collagen membrane with lactoferrin showed the best result at all times, while the customized collagen membrane did not significantly differ from the Mucograft membrane in CFU values and medium pH change. This provision was statistically significant for all three studied microorganisms.

**Conclusion.** The study showed the potential of using manufactured collagen membranes to eliminate soft tissue defects in the oral cavity under the condition of their surfaces' possible contamination as an alternative to foreign membranes.

**Keywords:** collagen membrane, oral cavity, microbial contamination, oral mucosal defect.

**For citation:** Svitich OA, Poddubikov AV, Timashev PS, Diachkova EYu, Gostev MS, Vartanova NO. Comparative analysis of the opportunistic oral microorganism growth on the surface of collagen membranes: experimental study. *Parodontologiya*. 2023;28(4):337-346 (in Russ.). <https://doi.org/10.33925/1683-3759-2023-804>.

## АКТУАЛЬНОСТЬ

Коллагеновые мембраны широко применяют в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии при довольно большом спектре операций, в том числе при направленной тканевой регенерации, костной пластике, реконструктивной пародонтологии [1-6].

Однако применение резорбируемых коллагеновых мембран требует тщательного укрывания местными мягкими тканями. Это связано с потенциальной контаминацией представителями условно-патогенной микрофлоры полости рта поверхности мембраны с последующим негативным влиянием на область устраняемого дефекта, начиная со снижения скорости регенерации в области раны и заканчивая развитием гнойно-воспалительных осложнений в связи с высокой адгезией бактерий на поверхности коллагенового матрикса и их довольно интенсивным ростом [7-11].

Тканевая инженерия является одной из наиболее важных биотехнологий в биомедицинской области, способной решить вопрос создания оптимальных материалов для хирургической стоматологии. Она

требует применения принципов научной инженерии для проектирования и создания природных или синтетических биоматериалов, пригодных для поддержания тканей и органов. В зависимости от конкретного применения выбор подходящего материала остается важной клинической проблемой. Имплант-ассоциированная инфекция является одним из самых серьезных осложнений при операциях по установке дентальных и других стоматологических имплантатов. Лечение этих инфекций затруднено, поскольку поверхность имплантата служит не только субстратом для формирования биопленки, которая формирует условия для селекции мультирезистентных бактериальных штаммов. Поэтому перспективным новым подходом к профилактике инфекций, связанных с имплантатами, является разработка новых имплантируемых биоматериалов на основе не антибиотиков. Таким веществом может быть и лактоферрин, которые применяют для создания антимикробных биоматериалов на основе пептидов [12]. Как известно, лактоферрин обладает способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку остеобластов, что свидетельствует о его потенциальной эффективности в качестве осте-

огенного фактора роста в инженерии костной ткани. Однако данный метод применения требует усовершенствования технологии системы доставки лекарственного вещества в зону интереса [13].

**Цель.** Провести сравнительный анализ роста условно-патогенных бактерий полости рта на различных коллагеновых мембранах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сравнительный анализ микробного роста на поверхности коллагеновых мембран проводили в два этапа: первый – разработка и получение коллагеновых мембран (Сеченовский Университет), второй – микробиологическое исследование при колонизации поверхности коллагеновых мембран штаммами условно-патогенных микроорганизмов полости рта.

### Разработка и изготовление мембран

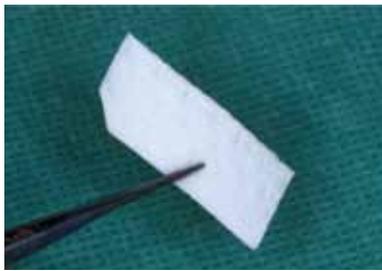
На базе Института регенеративной медицины научно-технологического Парка биомедицины были разработаны и синтезированы деградируемые коллагеновые мембраны на основе ахиллова сухожилия крупного рогатого скота. Работа выполнялась с использованием Уникальной научной установки «Трансгенбанк» при финансовой поддержке Российской Федерацией в лице Минобрнауки России в рамках проекта (Соглашение №075-15-2021-668 от 29.07.2021 г.).

Коллаген-лактоферриновая матрица была получена при помощи электроосаждения. Для этого использовали суспензию коллагена с концентрацией 5 мг/мл, а после к ней добавляли раствор лактоферрина (ИБГ РАН, Россия) так, чтобы массовое соотношение содержащихся в итоговой смеси коллагена и ЛФ было 9:1. Осаждение проводили в электрохимической ячейке, разделенной полупроницаемым барьером из регенерированной целлюлозы (Sigma-Aldrich) на две части, каждая из которых содержала либо анод, либо катод. В анодную часть ячейки заливали суспензию коллагена, а в катодную часть ячейки – дистиллированную воду. Катод и анод представляли собой пластинчатые электроды, к которым подключали источник постоянного тока напряжением 60 В, после чего проводили электроосаждение. Полученные мембраны осторожно отделяли от поверхности полупроницаемого барьера и обрабатывали в течение 20 минут изопропиловым спиртом, а затем сушили в ламинарном шкафу. Создание нескольких форм достигали за счет регулируемой химической сшивки мембран (в фосфатном буфере при помощи 0,01% глутаральдегида), механической перфорации с одной или двух сторон при помощи ролика с валиком, содержащим иглы длиной 1,5 мм, а также лиофилизации полученных мембран при минус 40 °С в течение 24 часов. За счет комбинирования методов сшивки, механической перфорации и лиофилизации были получены три различные персонализированные формы

**Таблица 1.** Количество жизнеспособных микроорганизмов в составе образовавшихся биопленок на образцах мембран (КОЕ)

**Table 1.** The number of viable microorganisms in the biofilms formed on the membrane surfaces (CFU)

№№ п/п No.	Мембрана Membrane	Микроорганизм Microorganism	3 суток Медиана [Мин-Макс] Three days Median [Min – Max]	5 суток Медиана [Мин-Макс] Five days Median [Min – Max]	7 суток Медиана [Мин-Макс] Seven days Median [Min – Max]	p
1	2	<i>Streptococcus mutans</i> №22081	2.5 × 10 <sup>7</sup> [2.6-2.7] × 10 <sup>7</sup>	2.5 × 10 <sup>7</sup> [2.6-2.7] × 10 <sup>7</sup>	1.3 × 10 <sup>7</sup> [1.2-1.4] × 10 <sup>7</sup>	<0.05
		<i>Staphylococcus aureus</i> №884	2.8 × 10 <sup>7</sup> [2.7-2.9] × 10 <sup>7</sup>	1.2 × 10 <sup>8</sup> [1.1-1.3] × 10 <sup>8</sup>	7.5 × 10 <sup>7</sup> [7.4-7.6] × 10 <sup>7</sup>	<0.05
		<i>Candida albicans</i> №15	7.2 × 10 <sup>6</sup> [7.1-7.3] × 10 <sup>6</sup>	4.5 × 10 <sup>6</sup> [4.4-4.6] × 10 <sup>6</sup>	4.0 × 10 <sup>6</sup> [3.9-4.1] × 10 <sup>6</sup>	<0.05
2	3	<i>Streptococcus mutans</i> №22081	8.0 × 10 <sup>6</sup> [7.9-8.1] × 10 <sup>6</sup>	3.5 × 10 <sup>7</sup> [3.4-3.6] × 10 <sup>7</sup>	1.5 × 10 <sup>7</sup> [1.4-1.6] × 10 <sup>7</sup>	<0.05
		<i>Staphylococcus aureus</i> №884	3.4 × 10 <sup>7</sup> [3.3-3.5] × 10 <sup>7</sup>	4.0 × 10 <sup>7</sup> [3.9-4.1] × 10 <sup>7</sup>	2.1 × 10 <sup>7</sup> [2.0-2.2] × 10 <sup>7</sup>	<0.05
		<i>Candida albicans</i> №15	5.0 × 10 <sup>6</sup> [4.9-5.1] × 10 <sup>6</sup>	5.5 × 10 <sup>6</sup> [5.4-5.6] × 10 <sup>6</sup>	2.5 × 10 <sup>5</sup> [2.4-2.6] × 10 <sup>5</sup>	<0.05
3	Mucograft	<i>Streptococcus mutans</i> №22081	1.2 × 10 <sup>7</sup> [1.1-1.3] × 10 <sup>7</sup>	8.0 × 10 <sup>7</sup> [7.9-8.1] × 10 <sup>7</sup>	2.5 × 10 <sup>7</sup> [2.4-2.6] × 10 <sup>7</sup>	<0.05
		<i>Staphylococcus aureus</i> №884	2.4 × 10 <sup>7</sup> [2.3-2.5] × 10 <sup>7</sup>	1.0 × 10 <sup>8</sup> [0.9-1.1] × 10 <sup>8</sup>	4.5 × 10 <sup>7</sup> [4.4-4.6] × 10 <sup>7</sup>	<0.05
		<i>Candida albicans</i> №15	7.0 × 10 <sup>6</sup> [6.9-7.1] × 10 <sup>6</sup>	3.5 × 10 <sup>6</sup> [3.4-3.6] × 10 <sup>6</sup>	6.5 × 10 <sup>6</sup> [6.4-6.6] × 10 <sup>6</sup>	<0.05



**Рис. 1.** Персонализированная коллагеновая мембрана на основе ахиллова сухожилия крупного рогатого скота

**Fig. 1.** Customized collagen membrane derived from bovine Achilles tendon

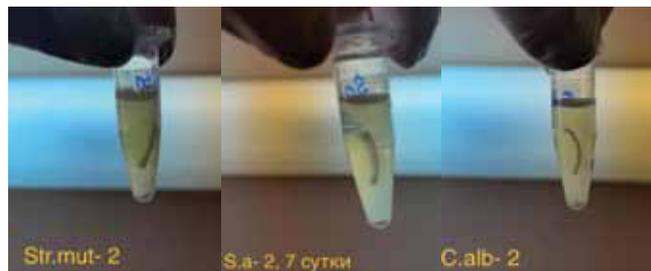
коллагеновой матрицы: мембрана, губка, интерфейс. Для стоматологии наибольшей перспективой обладает последняя форма (рис. 1).

В качестве контроля для исследования применяли мембрану Mucograft (Geistlich Pharma AG, Швейцария), представляющую собой матрицу из высокоочищенного свиного коллагена I и III типа без поперечных связей. Материал состоит из двух слоев: плотного, который обеспечивает стабильность материала в условиях открытого заживления, и губчатый слой стабилизирует кровяной сгусток и обеспечивает вращение клеток.

#### Микробиологическое исследование

Микробиологическое исследование было выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС имени И. И. Мечникова» – при финансовой поддержке проекта Российской Федерации в лице Минобрнауки России, Соглашение №075-15-2021-676 от 28.07.2021. На предварительном этапе было выполнено исследование состава микроорганизмов полости рта. По результатам исследования проб из полости рта наиболее часто и в большом объеме выделяли различные виды стрептококков, стафилококков, а также грибы рода *Candida*. Для проведения экспериментов были выбраны *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*, как наиболее клинически значимые. По этой причине в исследования были включены штаммы микроорганизмов из уникальной научной установки «Коллекция микроорганизмов III и IV групп патогенности НИИВС имени И. И. Мечникова» (номера штаммов указаны в таблице 1).

Получение видовых биопленок проводили по следующему протоколу. Для моделирования естественных условий, то есть для лучшей адгезии микроорганизмов, мембраны выдерживали 4 часа в пастеризованной слюне на шейкере при комнатной температуре. Сбор слюны осуществляли натошак, путем сплевывания в стерильную центрифужную пробирку. В сборе слюны для определения основных условно-патогенных бактерий участвовали шесть добровольцев в возрасте 20–60 лет. В исследовании использовали слюну, собранную в день ее использования. Слюну центрифугировали при режиме 4000 об/мин в течение 15 ми-



**Рис. 2.** Оценка активности микроорганизмов на поверхности коллагеновых мембран

**Fig. 2.** Evaluation of the microorganisms' activity on the surface of collagen membranes

нут при температуре 4 °С. Полученный супернатант подвергали пастеризации при 65 °С в течение 20 минут. Пастеризованную слюну повторно центрифугировали и пастеризовали при аналогичных условиях. Эффективность пастеризации контролировали путем прямого высева на колумбийский агар с добавлением дефибринированной крови.

Получение суспензии микроорганизма проводили по единому протоколу для всех микроорганизмов: маркированную ампулу с коллекционным лиофилизированным штаммом вскрывали в асептических условиях. Для растворения содержимого ампулы в нее вносили 0,5 мл стерильного сердечно-мозгового бульона. Полученную микробную суспензию переносили в пробирку с 2 мл сердечно-мозгового бульона и подращивали в течение двух часов в термостате при температуре 37 °С. Для восстановления полной жизнеспособности выполняли два пассажа на питательном агаре с добавлением лошадиной крови до 5%. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в 5% среде CO<sub>2</sub>. Видовую принадлежность подтверждали с использованием масс-спектрометрического метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (англ. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) с времяпролетным разделением (MALDI-ToF-MS). С помощью масс-спектрометра Sirius (Bruker, Германия).

Суспензию необходимой плотности получали путем смыва с плотной питательной среды с последующим денситометрическим контролем (0,8 Ед.МсF) (Денси-Ла-Метер II, Чехия, 1041658, Сертификат о калибровке № СК 0237790). Количество образцов мембраны для создания биопленок одного вида микроорганизма было равно 18.

Исследование образовавшихся биопленок на поверхности мембран выполняли на 3, 5, 7 сутки. В исследовании изучали мембраны трех видов: две – полученные на базе Сеченовского Университета (коллагеновую мембрану и коллагеновую мембрану с лактоферрином) и одну, коллагеновый матрикс Mucograft (Geistlich, Швейцария), – в качестве контроля.

Для получения биопленок исследуемую мембрану размером 0,5 x 1,0 см помещали в пробирку, содержащую 0,5 мл пастеризованной слюны, время экспозиции составляло 4 часа при комнатной температуре.

Слюну удаляли вакуумным аспиратором погружая наконечник на дно пробирки. Приготовленный инокулюм, содержащий питательную среду и микроорганизм, вносили по 1 мл в каждую пробирку с исследуемым образцом мембраны. Пробирки помещали на площадку шейкера с изменяющимся наклоном поверхности при температуре 37 °C и экспозиции 16 часов.

Ежедневно реакционную смесь извлекали из пробирок с помощью аспиратора до полного осушения. Во все пробирки автоматической пипеткой вносили по 1 мл инокулюма с соответствующим микроорганизмом. Описанный цикл повторяли в течение семи суток.

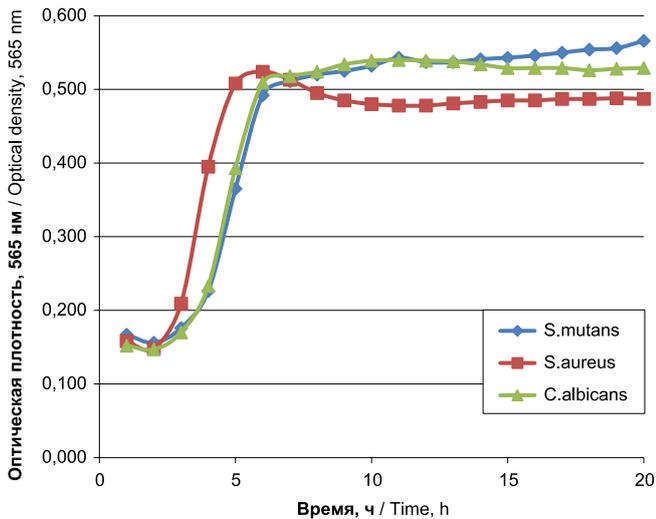


Рис. 3. Кривые роста и накопления биомассы использованных в исследовании штаммов микроорганизмов

Fig. 3. Curves of the studied microorganism strains' growth and biomass accumulation

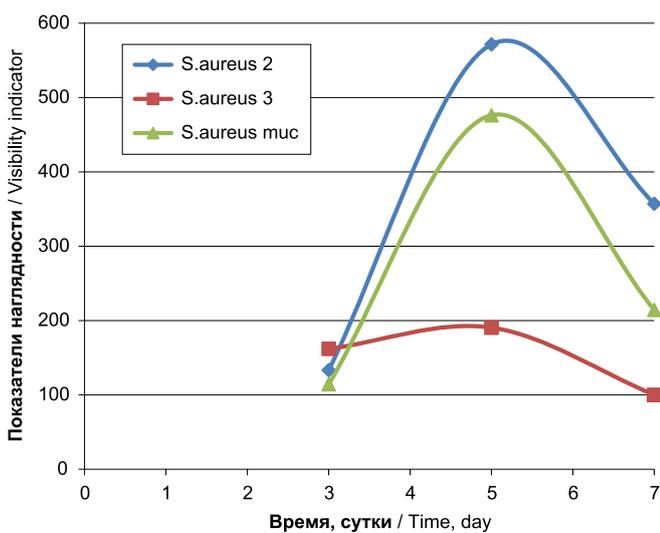


Рис. 5. Суточная динамика высева жизнеспособных клеток *S. aureus* из биопленок, образовавшихся на мембранах (в показателях наглядности)

Fig. 3. Daily dynamics of viable *S. aureus* cell seeding from the biofilms formed on membranes (Visibility indicator)

Контроль образования биопленок осуществляли визуально и готовили препараты-мазки с окраской по Граму. Таким образом, все исследуемые образцы разделили на четыре группы по три образца в каждой: в 1-й (контрольной) анализировали характер роста бактерий без их помещения на поверхность коллагеновой мембраны; во 2-й – микробный рост на поверхности персонализированной коллагеновой мембраны (мембрана 2); в 3-й – рост бактерий на поверхности коллагеновой мембраны с лактоферрином (мембрана 3); в 4-й (сравнения) – микробный рост на поверхности коллагенового матрикса Mucograft.

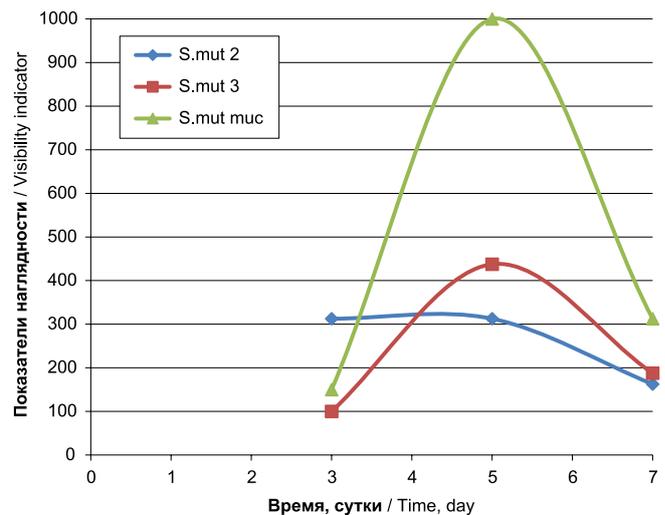


Рис. 4. Суточная динамика высева жизнеспособных клеток *S. mutans* из биопленок, образовавшихся на мембранах (в показателях наглядности)

Fig. 4. Daily dynamics of viable *S. mutans* cell seeding from the biofilms formed on membranes (Visibility indicator)

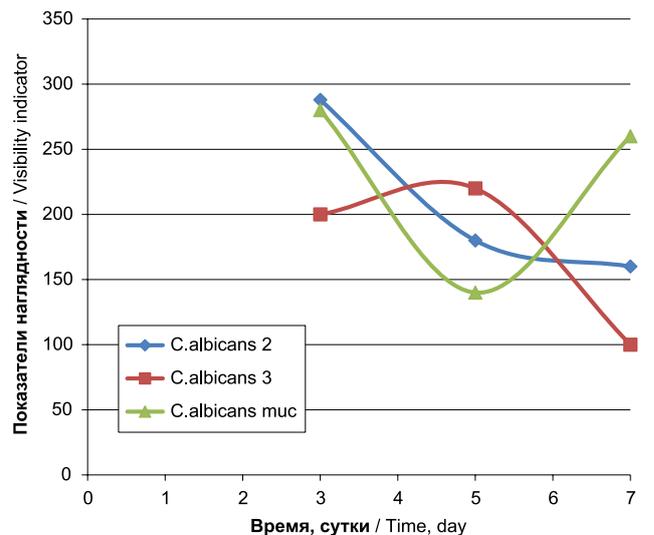


Рис. 6. Суточная динамика высева жизнеспособных клеток *C. albicans* из биопленок, образовавшихся на мембранах (в показателях наглядности)

Fig. 4. Daily dynamics of viable *C. albicans* cell seeding from the biofilms formed on membranes (Visibility indicator)

**Процедура анализа**

Измерение рН (водородного показателя) выполняли с использованием рН метра («ЭСПЕРТ-рН», зав №3809, дата поверки 29.07.2022) и микроэлектрода ЭСК-10614/7 (ТУ 4215-004-35918409-2008, Россия). Анализ результатов проводили на третьи, пятые и седьмые сутки. Для этого стерильным пинцетом мембрану переносили в пробирку с 1 мл деионизированной воды при экспозиции 5 минут. Отмытую таким образом мембрану переносили в пробирку с 500 мкл 10% сахарозы и подвергали активному перемешиванию на вортексе в течение 1 минуты, 20 мкл образовавшейся суспензии отбирали для приготовления серийных разведений с целью определения количества жизнеспособных бактерий и сразу приступали к измерению рН. Временные точки измерения были: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 мин. По завершении исследования электрод отмывали и описанную процедуру повторяли в отношении следующего образца мембраны.

В отношении контрольной пробы с микроорганизмами (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*), после 7 суток эксперимента аналогично мембранам была произведена оценка влияния 20 мкл среды культивирования и контроля выращивания (суточный инокулем без мембраны) на рН 10% раствора сахарозы (рис. 2).

По завершении исследования все изучаемые жидкости и одноразовые материалы были обеззаражены в соответствии со стандартной операционной процедурой в отношении отходов класса Б.

**Статистическая обработка данных**

При изучении количественных признаков проводили определение медиан, минимальных и максимальных значений. Сравнение между группами проводили с помощью критерия Краскелла – Уоллиса (в связи с ненормальным распределением выборок по критерию Шапиро – Уилкса), статистически значимыми результаты считали при достоверности более 95% ( $p < 0,05$ ).

**РЕЗУЛЬТАТЫ****Анализ количественного изменения микроорганизмов на поверхности коллагеновых мембран**

Результаты микробного роста условно-патогенных бактерий на поверхности коллагеновых мембран на различных сроках исследования представлены в таблице 1. КОЕ определяли методом прямого высева 10 кратных разведений, механически разрушенных при встряхивании на вортексе биопленок.

На рисунке 3 представлены кривые роста использованных в исследовании штаммов, которые были составлены после применения планшетного спектрофотометра FlexA-200 (ALLSHENG, Китай) для кинетического метода исследования.

В результате исследования ростовых свойств использованных в исследовании штаммов микроорганизмов можно констатировать незначительные

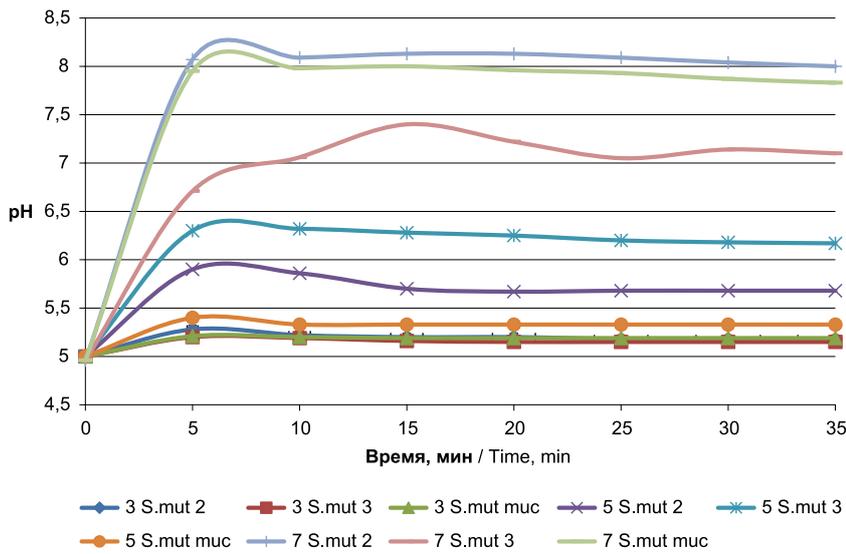
отличия в продолжительности основных фаз роста и способности накопления биомассы. Схожие ростовые свойства штаммов различных родов и видов в планктонной культуре могут иметь существенные различия при формировании биопленок.

Согласно результатам исследования (табл. 1), для *Streptococcus mutans* №22081 количество жизнеспособных бактерий в составе образовавшихся трехсуточных биопленок на разных мембранах находилось в диапазоне  $8,0 \times 10^6 - 2,5 \times 10^7$ . Наименьшее количество КОЕ было обнаружено при разрушении мембраны 3 ( $8,0 \times 10^6$ ), несколько больше высевали с мембраны Mucograft –  $1,2 \times 10^7$ , с мембраны 2 высева был в 3 раза больше –  $2,5 \times 10^7$  ( $p < 0,05$ ). Результаты высева жизнеспособных клеток на 5 сутки формирования указывают на резкое увеличение КОЕ у мембран: №3 – в 4,3 раза, Mucograft – 10 раз, при этом у мембраны 2 число КОЕ оставалось прежним ( $p < 0,05$ ). Высева после 7 суток формирования биопленок свидетельствует о снижении КОЕ у всех исследованных видов мембран ( $p < 0,05$ ). Результаты высева в показателях наглядности (за 100% принимали наименьшее значение КОЕ) представлены на рисунке 4. Аналогично *S. mutans*, данные по *S. aureus* и *C. albicans* представлены на рисунках 5 и 6.

**Анализ влияния роста биопленок на рН 10% раствора сахарозы**

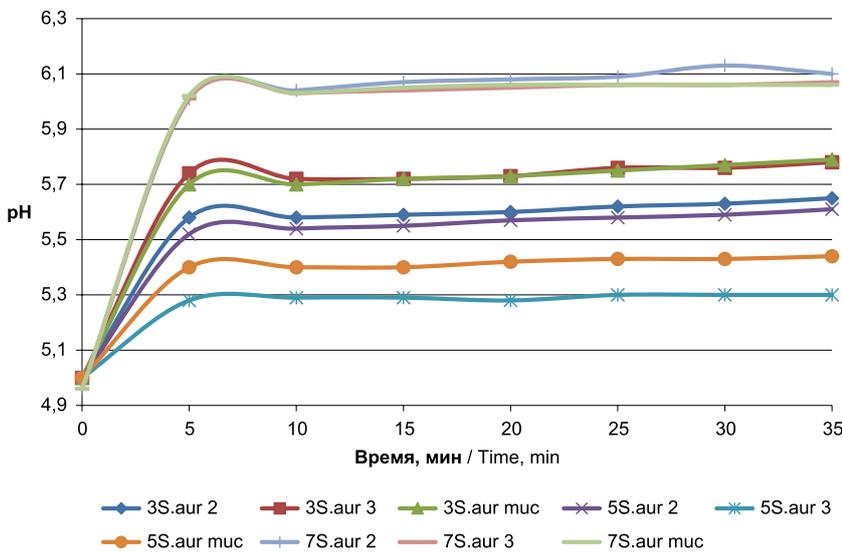
При изучении изменения рН 10% раствора сахарозы было отмечено, что на 3 сутки исследования для бактерии *S. mutans* к 30 минуте наибольшее смещение к щелочной среде происходило в среде микроорганизмов на поверхности коллагеновой мембраны, наименьшее – для коллагеновой мембраны с лактоферрином ( $p > 0,05$ ). Для *S. aureus* отмечали умеренное увеличение рН среды для мембраны с лактоферрином и для Mucograft, тогда как в случае персонализированной коллагеновой мембраны рН среды практически оставалось неизменным (около 5,5) ( $p = 0,01$ ,  $p < 0,05$ ); для *C. albicans* также, как и для *S. mutans*, наибольшее защелачивание среды отмечали для персонализированной коллагеновой мембраны, однако наименьшее влияние на рН оказывали микроорганизмы на поверхности мембраны Mucograft ( $p = 0,002$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 7-9).

На 5 сутки исследования для *S. mutans* рН в области всех мембран снижалось и значения приближались к исходному – 5,5, однако наименьшим значением обладала мембрана Mucograft, наиболее высоким – персонализированная коллагеновая мембрана с лактоферрином ( $p = 0,002$ ,  $p < 0,05$ ); для *S. aureus* происходило повышение рН для персонализированной коллагеновой мембраны, тогда как для мембраны с лактоферрином и для Mucograft наблюдали обратный эффект – его снижение к возвращению исходных значений и некоторому закислению (для Mucograft) ( $p = 0,002$ ,  $p < 0,05$ ). Для *C. albicans* также происходило снижение рН для всех мембран, однако



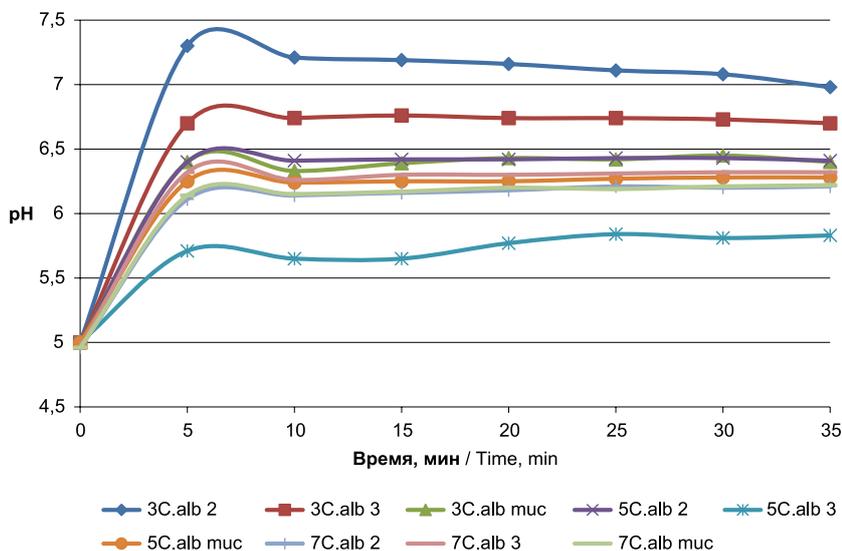
**Рис. 7.**  
Влияние искусственных биопленок *S. mutans* (3, 5, 7 сутки образования), полученных с мембраны 2, мембраны 3 и Mucograft, на pH 10% раствора сахарозы

**Fig. 7.**  
Effect of artificial *S. mutans* biofilms (Day 3, 5, 7 of formation) formed on membranes 2, 3 and Mucograft on the pH of a 10% sucrose solution



**Рис. 8.**  
Влияние искусственных биопленок *S. aureus* (3, 5, 7 сутки образования), полученных с мембраны 2, мембраны 3 и Mucograft, на pH 10% раствора сахарозы

**Fig. 8.**  
Effect of artificial *S. aureus* biofilms (Day 3, 5, 7 of formation) formed on membranes 2, 3 and Mucograft on the pH of a 10% sucrose solution



**Рис. 9.**  
Влияние искусственных биопленок *C. albicans* (3, 5, 7 сутки образования), полученных с мембраны 2, мембраны 3 и Mucograft, на pH 10% раствора

**Fig. 9.**  
Effect of artificial *C. albicans* biofilms (Day 3, 5, 7 of formation) formed on membranes 2, 3 and Mucograft on the pH of a 10% sucrose solution

наибольшим значением обладала персонализированная коллагеновая мембрана, наименьшим – коллагеновая мембрана с лактоферрином ( $p = 0,002$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 7-9).

На 7 сутки для бактерий *S. mutans* отметили дальнейшее снижение pH среды по сравнению с исходным значением 5,5 для всех мембран с незначительным закислением ( $p = 0,003$ ,  $p < 0,05$ ); для *S. aureus* происходило дальнейшее защелачивание среды, большее – для персонализированной коллагеновой мембраны, тогда как для мембраны с лактоферрином и мембраны Mucograft значения были близки ( $p = 0,3$ ,  $p > 0,05$ ); для *C. albicans* происходило выравнивание значения pH для всех мембран к схожим значениям, но выше изначального 5,5 ( $p = 0,01$ ,  $p < 0,05$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

которая может быть внедрена в клиническую практику для оценки эффективности их использования. Разработанные на базе Института регенеративной медицины коллагеновые мембраны показали сопоставимые (персонализированная коллагеновая мембрана) и значительно лучшие (коллагеновая мембрана с лактоферрином) результаты по сравнению с зарубежным аналогом и могут быть рекомендованы для клинического применения при устранении обширных дефектов слизистой оболочки рта.

## Информация о финансировании

Работа выполнялась с использованием Уникальной научной установки «Трансгенбанк» при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России (Соглашение №075-15-2021-668 от 29.07.2021 г.). Микробиологическое исследование было выполнено при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России (Соглашение №075-15-2021-676 от 28.07.2021).

## Funding

The study was performed using the “Transgenebank” Unique Scientific Facility with financial support of the Russian Federation represented by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement #075-15-2021-668 of 29.07.2021). The microbiological study was supported by the Russian Federation represented by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement #075-15-2021-676 of 28.07.2021).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тарасенко СВ, Благушина НА. Гистологическая оценка использования биорезорбируемых коллагеновых мембран при закрытии раневых дефектов слизистой оболочки рта в эксперименте. *Вятский медицинский вестник*. 2022;1(73):67-75.  
doi: 10.24412/2220-7880-2022-1-67-75
2. Toledano M, Toledano-Osorio M, Carrasco-Carmona Á, Vallecillo C, Lynch CD, Osorio MT et al. State of the Art on Biomaterials for Soft Tissue Augmentation in the Oral Cavity. Part I: Natural Polymers-Based Biomaterials. *Polymers*. 2020;12:1850.  
doi: 10.3390/polym12081850
3. Preidl RHM, Reichert S, Coronel TV, Kesting M, Wehrhan F & Schmitt CM. Free gingival graft and collagen matrix revascularization in an enoral open wound situation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2021;79(5):1027-1037.  
doi: 10.1016/j.joms.2020.12.019
4. Дьячкова ЕЮ, Тарасенко СВ, Дыдыкин СС. Хирургическое лечение пациентов с хроническим перфоративным гайморитом с применением различных форм ксеногенного материала на основе коллагена. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(4):628-630.  
doi: 10.14300/mnnc.2019.14156
5. Мележечкина ИА, Атрушкевич ВГ, Берченко ГН. Сравнительная морфологическая оценка качества биоинтеграции шитых и несшитых ксеногенных материалов. *Пародонтология*. 2022;27(4):288-297.  
doi: 10.33925/1683-3759-2022-27-4-288-297
6. Tarasenko S, Ashurko I, Taschieri S. Comparative analysis of methods to increase the amount of keratinized mucosa before stage-two surgery: a randomized controlled study. *Quintessence International*. 2020;51(5):374-387.  
doi: 10.3290/j.qi.a44216
7. Рачков АА, Шевела ТЛ, Евтухов ВЛ. Особенности применения барьерных мембран в условиях микробной контаминации операционных ран полости рта. *Стоматолог*. Минск. 2018;(2):87-89. Режим доступа: [http://journal-stomatolog.by/wp-content/uploads/2018/08/stomatologist\\_229\\_20181.pdf](http://journal-stomatolog.by/wp-content/uploads/2018/08/stomatologist_229_20181.pdf)
8. Коняева АД, Варакута ЕЮ, Лейман АЕ, Бадарев АД, Большасов ЕН. Эффективность использования нетканых пьезоэлектрических полимерных мембран на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом для закрытия раневых дефектов слизистой оболочки полости рта. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2020;9(2):40-45.  
doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-2-40-45
9. Love R.M. Biofilm–substrate interaction: from initial adhesion to complex interactions and biofilm maturity. *Endodontic Topics*. 2010;22(1):50-57.  
doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00280.x

10. Álvarez S, Leiva-Sabadini C, Schuh CMAP, Aguayo S. Bacterial adhesion to collagens: implications for biofilm formation and disease progression in the oral cavity. *Critical Reviews in Microbiology*. 2022;48(1):83-95. doi: 10.1080/1040841X.2021.1944054

11. Echazú MIA, Tuttolomondo MV, Foglia ML, Mebert AM, Alvarez GS, Desimone MF. Advances in collagen, chitosan and silica biomaterials for oral tissue regeneration: from basics to clinical trials. *Journal of*

*Materials Chemistry B*. 2016;4(43):6913-6929.

doi: 10.1039/C6TB02108E

12. Pall E, Roman A. Lactoferrin functionalized biomaterials: Tools for prevention of implant-associated infections. *Antibiotics*. 2020;9(8):522.

doi: 10.3390/antibiotics9080522

13. Takayama Y. Lactoferrin and its role in wound healing. *Springer Dordrecht*; 2011:108 p.

doi: 10.1007/978-94-007-2467-9

## REFERENCES

1. Tarasenko SV, Blagushina NA. Experimental histological evaluation of bioresorbable collagen membrane use in surgical oral mucosal defects. *Vjatskij medicinskij vestnik*. 2022;1(73):67-75 (In Russ.).

doi: 10.24412/2220-7880-2022-1-67-75

2. Toledano M, Toledano-Osorio M, Carrasco-Carmona Á, Vallecillo C, Lynch CD, Osorio MT et al. State of the Art on Biomaterials for Soft Tissue Augmentation in the Oral Cavity. Part I: Natural Polymers-Based Biomaterials. *Polymers*. 2020;12:1850.

doi: 10.3390/polym12081850

3. Preidl RHM, Reichert S, Coronel TV, Kesting M, Wehrhan F & Schmitt CM. Free gingival graft and collagen matrix revascularization in an enoral open wound situation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2021;79(5):1027-1037.

doi: 10.1016/j.joms.2020.12.019

4. Diachkova EYu, Tarasenko SV, Dydykin SS. Surgical treatment of patients with perforated chronic maxillary sinusitis using different forms of collagen-based xenogenic material. *Medical news of North Caucasus*. 2019;14(4):628-630 (In Russ.).

doi: 10.14300/mnnc.2019.14156

5. Melezhechkina IA, Atrushkevich VG, Berchenko GN. Comparative morphological assessment of crosslinked and non-crosslinked xenograft biointegration quality. *Parodontologiya*. 2022;27(4):288-297 (In Russ.).

doi: 10.33925/1683-3759-2022-27-4-288-297

6. Tarasenko S, Ashurko I, Taschieri S, Repina S, Esaya N A, Corbella S. Comparative analysis of methods to increase the amount of keratinized mucosa before stage-two surgery: a randomized controlled study. *Quintessence Int*. 2020;51(5):374-387.

doi: 10.3290/j.qi.a44216

7. Rachkov AA, Shevela TL, Evtuhov VL. Specific features of using barrier membranes in conditions of microbial contamination of surgical wounds in oral cavity. *Stomatologist*. 2018;2:87-89 (In Russ.). Available from:

[http://journal-stomatolog.by/wp-content/uploads/2018/08/stomatologist\\_229\\_20181.pdf](http://journal-stomatolog.by/wp-content/uploads/2018/08/stomatologist_229_20181.pdf)

8. Konyaeva AD, Varakuta EYu, Leiman AE, Badaraev AD, Bol'basov EN. Effectiveness of Non-Woven Piezoelectric Polymer Membrane Application Based on a Co-Polymer of Vinylidene Fluoride with Tetrafluoroethylene for Oral Wound Closure. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2020;9(2):40-45 (In Russ.).

doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-2-40-45

9. Love RM. Biofilm-substrate interaction: from initial adhesion to complex interactions and biofilm maturity. *Endodontic Topics*. 2010; 22(1): 50-57.

doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00280.x

10. Álvarez S, Leiva-Sabadini C, Schuh CMAP, Aguayo S. Bacterial adhesion to collagens: implications for biofilm formation and disease progression in the oral cavity. *Critical Reviews in Microbiology*. 2022;48(1):83-95.

doi: 10.1080/1040841X.2021.1944054

11. Echazú MIA, Tuttolomondo MV, Foglia ML, Mebert AM, Alvarez GS, Desimone MF. Advances in collagen, chitosan and silica biomaterials for oral tissue regeneration: from basics to clinical trials. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016;4(43):6913-6929.

doi: 10.1039/C6TB02108E

12. Pall E, Roman A. Lactoferrin functionalized biomaterials: Tools for prevention of implant-associated infections. *Antibiotics*. 2020;9(8):522.

doi: 10.3390/antibiotics9080522

13. Takayama Y. Lactoferrin and its role in wound healing. *Springer Dordrecht*; 2011:108 p.

doi: 10.1007/978-94-007-2467-9

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Свитич Оксана Анатольевна**, член-корреспондент Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, директор научно-исследовательского института вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва, Российская Федерация

Для переписки: svitichoa@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

**Поддубиков Александр Владимирович**, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией микробиологии условно-патогенных бактерий научно-исследовательского института вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва, Российская Федерация

Для переписки: poddubikov@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

**Тимашев Петр Сергеевич**, доктор химических наук, профессор, директор Научно-технологического парка биомедицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), старший научный сотрудник Института биологии гена Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

Для переписки: timashev\_p\_s@staff.sechenov.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7773-2435>

**Автор, ответственный за связь с редакцией:**

**Дьячкова Екатерина Юрьевна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры хирургической стоматологии Института стоматологии имени Е.В. Боровского Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Для переписки: secu2003@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4388-8911>

**Гостев Михаил Сергеевич**, ассистент кафедры хирургической стоматологии Института стоматологии имени Е. В. Боровского Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Для переписки: doktorgostev@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6810-6555>

**Вартанова Нунэ Оганесовна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии условно-патогенных бактерий научно-исследовательского института вакцин и сыровороток имени И. И. Мечникова, Москва, Российская Федерация

Для переписки: secu2003@gmail.com  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6372-9910>

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Oxana A. Svitich**, MD, PhD, DSc, Corresponding member of the RAS, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director of I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera

For correspondence: svitichoa@yandex.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

**Alexander V. Poddubikov**, MD, PhD, Head of the Laboratory of microbiology of opportunistic bacteria, I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

For correspondence: poddubikov@yandex.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

**Peter S. Timashev**, PhD (Chemistry), DSc, Professor, Head of Sechenov Biomedicine Science & Technology Park, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Leading Researcher, Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

For correspondence: timashev\_p\_s@staff.sechenov.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7773-2435>

**Ekaterina Yu. Diachkova**, DMD, PhD, Associate Professor, Department of Oral Surgery, Borovskiy Institute of Dentistry, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

For correspondence: secu2003@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4388-8911>

**Mikhail S. Gostev**, DDS, Assistant Professor, Department of Oral Surgery, Borovskiy Institute of Dentistry, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

For correspondence: doktorgostev@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6810-6555>

**Nune O. Vartanova**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Opportunistic Bacteria, I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

For correspondence: secu2003@gmail.com  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6372-9910>

### **Конфликт интересов:**

**Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов/ Conflict of interests:**

*The authors declare no conflict of interests*

**Поступила / Article received 02.06.2023**

*Поступила после рецензирования / Revised 06.03.2023*

*Принята к публикации / Accepted 21.08.2023*