

Статья

Клинические и гистологические различия, наблюдаемые при направленной регенерации тканей с применением бесклеточного дермального матрикса свиного происхождения и аутологичной соединительной ткани: исследование на животных

Хавьер Арагонесес¹, Ана Суарес^{2,*}, Синтия Родригес³ и Хуан Мануэль Арагонесес⁴

¹ Кафедра медицины и медицинских специальностей, Факультет медицинских наук, Universidad Alcalá de Henares, 28871 Мадрид, Испания; javias511@gmail.com

² Кафедра доклинической стоматологии, Школа биомедицинских наук, Universidad Europea de Madrid, 28670 Мадрид, Испания

³ Кафедра стоматологии, Universidad Federico Henríquez y Carvajal, Санто-Доминго 10106, Доминиканская республика; cinthiagarabitos@gmail.com

⁴ Декан Факультета стоматологии, Universidad Alfonso X El Sabio, 28691 Мадрид, Испания; jmaragoneses@gmail.com

* Корреспонденция: ana.suarez@universidadeuropea.es

Аннотация: настоящее исследование проводилось для оценки клинических и гистологических различий в приросте кератинизированной ткани при использовании двух методик направленной регенерации: с применением субэпителиального аутологичного соединительнотканного трансплантата (АСТТ) и бесклеточного дермального матрикса (БДМ) свиного происхождения в костном ложе, сформированном у экспериментальных животных на участках адентии. Изменения, наблюдаемые в группах БДМ и АСТТ, сравнивали с изменениями, наблюдаемыми в контрольной группе (КГ) через 15, 45 и 90 дней. В исследовании использовали девять самок белой породы свиней (подвид: домашняя свинья — *Sus scrofa domestica*). У каждого животного формировали по 20 участков для внедрения трансплантатов (12 БДМ и 8 АСТТ). Через 15 дней толщина кератинового слоя в группе БДМ была больше, чем в группе АСТТ (25,27 по сравнению с 19,95 мкм) и КГ (21,2 мкм). Через 45 дней толщина кератинового слоя в группах БДМ и АСТТ уменьшилась, однако все равно была выше, чем в КГ. Через 90 дней в группе БДМ регистрировалось значение (19,46 мкм), близкое к толщине кератинового слоя в контрольной группе (КГ), а в группе АСТТ данное значение снизилось до уровня, регистрируемого в КГ (15,53 мкм, $p < 0,001$). Использование БДМ может являться разумной альтернативой применения АСТТ, благодаря его способности обеспечивать увеличение толщины кератинизированной ткани по сравнению с АСТТ.

Ключевые слова: аутологичный соединительнотканый трансплантат; бесклеточный дермальный матрикс; трансплантаты; кератинизированная слизистая оболочка

1. Введение

С целью удовлетворения эстетических запросов пациентов в пародонтальной хирургии все чаще применяют регенеративные методы лечения, направленные на увеличение степени кератинизации десен [1,2]. В течение долгих лет «золотым стандартом» считались хирургические методики с использованием субэпителиального аутологичного соединительнотканного трансплантата (АСТТ) [3–6]. Однако методики регенерации с использованием АСТТ имеют ряд недостатков, включающих повышение частоты послеоперационной заболеваемости и более

высокий риск возникновения осложнений, таких как: послеоперационная боль, кровотечение и некроз тканей [7–9], а также эстетические ограничения [10–14].

Методы, которые предполагают использование стволовых клеток для реконструкции мягких тканей полости рта, показывают многообещающие результаты [15–19]; однако они являются дорогостоящими и требуют большего количества документированных случаев для клинического применения [8]. В настоящее время возможной альтернативой является применение регенеративных методик с использованием бесклеточных матриц. Первый бесклеточный матрикс, использованный в стоматологии, был получен из кожи трупа человека [20,21]. За последнее время появился пул данных, подтверждающих безопасность, целесообразность и эффективность применения других методик, предусматривающих использование различных ксеногенных матриц [22–24]. Таким образом, применение бесклеточных дермальных коллагеновых матриц свиного происхождения является вариантом выбора при проведении направленной регенерации тканей [25]; однако исследований, поддерживающих с научной точки зрения целесообразность их применения в клинической практике, а также приводящих результаты сравнения наблюдаемых гистологических изменений, немного [26]. Учитывая все вышеизложенное, настоящее клиническое исследование было проведено для оценки клинических и гистологических изменений степени кератинизации тканей в области оперативного вмешательства после использования регенеративных методик, в том числе с применением бесклеточного дермального матрикса свиного происхождения (БДМ), по сравнению с результатами, полученными с использованием АСТТ.

2. Материалы и методы

2.1. Этические аспекты использования животных в исследованиях

Проект протокола исследования на животных был одобрен комитетом по этике и защите прав животных Университетской клиники Пуэрта де Йерро, Махадаонда, Испания. Процедуру проводили согласно европейским (Директива 2010.63.EU) и испанским (RD 53/2013) нормам, регулирующим обращение с экспериментальными животными и регламентирующим условия их содержания. В исследовании использовали 9 здоровых самок домашней свиньи (*Sus scrofa domestica*) [27]. В ходе исследования все животные получали пищу согласно назначенной щадящей диеты.

2.2. Хирургическое вмешательство

У каждого животного формировали по 20 тестовых участков: на 12 применяли БДМ, на остальных 8 дефектах — АСТТ. В рамках исследования оценку результатов проводили трижды: через 15 дней, 45 дней и 90 дней после хирургического вмешательства. Ткани, удаленные в процессе формирования хирургического ложа, использовали для создания контрольной группы (КГ). Животным проводили премедикацию, в рамках которой внутримышечно вводили комбинацию медетомидина гидрохлорида 0,01 мг/кг (Medeson[®], Uranus Vet, Барселона, Испания), кетамина 5 мг/кг (Ketalar[®], Pfizer, Нью-Йорк, США), мидазолама 0,2 мг/кг (Combino Pharm, Барселона, Испания) и атропина 0,02 мг/кг (Braun Medical, Осс, Нидерланды). С целью индукции общей анестезии и получения возможности выполнения интубации трахеи внутривенно вводили пропофол в дозировке 1 мг/кг («Фрезениус Каби», Бад-Хомбург, Германия).

Весь объем хирургических манипуляций был выполнен одним хирургом, который провел местную анестезию посредством инфильтрации тканей смесью артикаина с адреналином 1/200 000 объемом 1,8 мл (Ultrasain[®], Hoeschst, Франкфурт, Германия). Позднее на кератинизированной ткани с помощью хирургического трепана были сформированы лунки диаметром 5 мм (по 5 на квадрант) на участках адентии с удалением эпителия и обнажением слоя подлежащей

соединительной ткани. В 5 лунок, сформированных в каждом квадранте, помещали исследуемые материалы: три использовали для размещения бесклеточного дермального матрикса свиного происхождения (OsteoBiol® Derma, Tecpox®, Джавено, Италия), два — для размещения АСТТ. Распределение материалов проводили в случайном порядке (рис. 1).



Рисунок 1. Костные ложа в верхнем квадранте.

При внесении БДМ не проводили ушивание операционной раны в поперечном направлении, фиксацию трансплантата осуществляли с помощью микровинта диаметром 2 мм (Sweden & Martina®, Дуэ-Карраре, Италия), вкручиваемого в центр лунки. После фиксации трансплантата накладывали поперечный горизонтальный наружный шов с помощью хирургической плетеной нити 5-0, изготовленной из шелка, режущей иглы (Sweden & Martina®, Дуэ-Карраре, Италия), иглодержателя Castroviejo и прямых тканевых щипцов 41 Adson (Hu-Friedy Mfg. Co., Франкфурт, Германия). Для получения аутологичных соединительнотканых трансплантатов с неба животных, на половине неба на определенных квадрантах проводили анестезию артикаином и адреналином 1/200 000 (Ultracain®, Hoechst, Франкфурт, Германия). Далее использовали методику двойного разреза с помощью лезвия скальпеля № 15С и прямой круглой рукояткой скальпеля номер №5 (Hu-Friedy Mfg. Co., Франкфурт, Германия). Небное донорское ложе зашивали двумя горизонтальными матрасными швами и дополнительно закрепляли одиночными швами с использованием плетеной шелковой одинарной хирургической нити 5-0 и режущей иглой (Sweden & Martina®, Дуэ-Карраре, Италия). Трансплантат делили на восемь частей одинакового размера и помещали в каждое реципиентное ложе, используя плетеную шелковую одинарную хирургическую нить 5-0 и режущую иглу (Sweden & Martina®) для наложения поперечного горизонтального наружного шва, после чего трансплантат фиксировали посредством помещения в центр ложа микровинта диаметром 2 мм (Sweden & Martina®, Дуэ-Карраре, Италия; рис. 2).



Рисунок 2. Бесклеточный дермальный матрикс (в центре) и субэпителиальный аутологичный соединительнотканый трансплантат (слева), размещенный в костном ложе.

2.3. Этаназия

После проведения запланированной биопсии выполняли контролируемое и регулируемое усыпление экспериментальных животных, в рамках которого ветеринар вводил внутривенно избыточную дозу натрия пентобарбитала (Pfizer, Нью-Йорк, США). Животным предварительно проводили седацию с помощью медетомидина гидрохлорида в дозировке 0,01 мг/кг (Medeson[®], Uranus Vet, Барселона, Испания) и кетамина в дозировке 5 мг/кг (Ketalar[®], Pfizer, Нью-Йорк, США).

2.4. Гистологическое исследование

Проводили оценку толщины кератинового слоя и эпителия (длину эпидермальных гребней). С этой целью все изученные образцы, полученные в разное время, фиксировали путем погружения в 3,7%-й нейтральный буферный раствор формалина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, США) на 48 ч, после чего образцы обезживали посредством последовательного погружения в этиловый спирт 70°, 90° и 100° (MilliporeSigma, Берлингтон, штат Массачусетс, США). Затем образцы отмачивали в керосине (MilliporeSigma, Берлингтон, США) в ходе фазы включения, после чего нарезали микротомом, формируя срезы со средней толщиной около 5 мкм (Leica Biosystems, Нуслох, Германия). Затем для проведения дальнейшей оценки образцы окрашивали гематоксилином и эозином (MilliporeSigma, США). Гистоморфометрический анализ проводили с использованием светопольного оптического микроскопа (Olympus BX41, Olympus Corporation, Синдзюку, Япония) с соответствующим программным обеспечением для анализа изображений (Image Pro Plus 6.0, Stemmer Imaging AG, Пуххайм, Германия).

Для каждого гистологического среза оценивали два параметра:

- толщину кератинового слоя;
- толщину эпителиальной ткани, измеренную от коронковой части зернистого слоя до верхушечной части эпителиального гребня.

Каждый параметр оценивали в трех различных областях, среднее значение этих измерений принимали в качестве среднего значения для гистологического среза. Среднее значение всех гистологических срезов принимали за среднее значение для каждой точки последующего наблюдения.

2.5. Клиническая оценка

Клиническую оценку проводили посредством прямой визуализации слизистой оболочки ротовой полости животных. С этой целью делали фотографии, используя цифровую зеркальную фотокамеру (Canon EOS 650, Canon, Токио, Япония) со 100 мм объективом (Canon EF 100 mm f/2.8

L Macro, Canon, Токио, Япония) и кольцевой вспышкой (Macro Ring Lite MR-14EX II, Canon, Токио, Япония). Цвет и эстетические результаты применения обоих методов лечения оценивали визуально, изучая обработанные области в сравнении с прилежащими тканями здоровой кератинизированной десны. Независимый эксперт, выполняющий оценку, не был осведомлен относительно примененного лечения в каждом конкретном случае.

2.6. Статистический анализ

Для экспериментальной и контрольной групп рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение для каждого измеренного гистологического параметра. Поскольку группы не соответствовали нормальному распределению в отношении рандомизированных данных (значение $p < 0,005$), для сравнений использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Уровень значимости, выбранный для всех статистических тестов, составлял $p < 0,05$.

3. Результаты

3.1. Клиническая оценка

3.1.1. Через 15 дней

Области, на которых применяли БДМ, характеризовались очевидной реэпителизацией, а также более красным цветом по сравнению со здоровыми тканями, и несколькими областями белесого цвета. В местах установки микровинтов ткани имели фиолетовый оттенок, а также признаки воспаления и отека, что могло быть следствием имплантации микровинтов или скопления микробного налета на головках винтов. Вокруг контура стежков, выполненных шелковой нитью, отмечали легкий отек тканей. Области, на которых применяли АСТТ, представляли собой поверхность, полностью покрытую эпителием, цвет которой был несколько более красноватым по сравнению со здоровыми тканями животного (рис. 3).

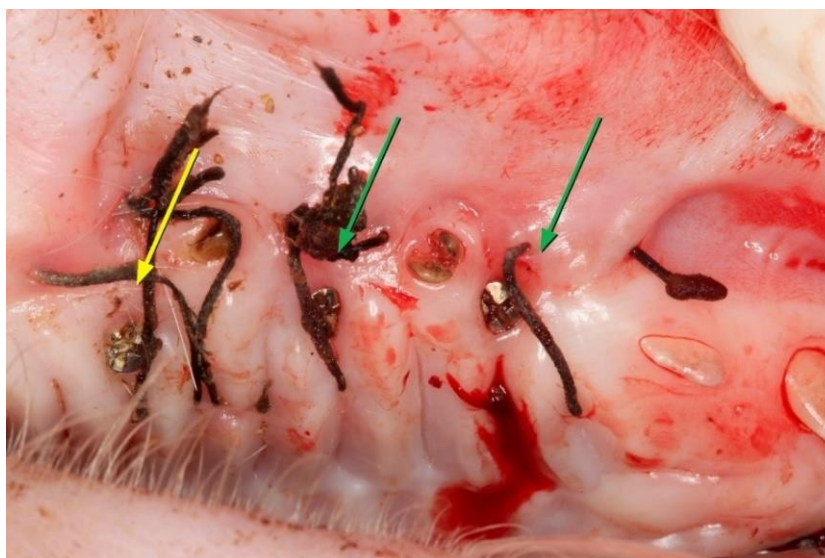


Рисунок 3. Состояние трансплантата через 15 дней после установки. Желтой стрелкой отмечено место размещения аутологичного соединительнотканного трансплантата (АСТТ), зелеными стрелками — дермальный матрикс (БДМ).

3.1.2. Через 45 дней

В областях размещения БДМ отмечали полное клиническое заживление без каких-либо различий структуры, цвета или внешнего вида по сравнению с прилежащими тканями. Кератинизация была очевидной, при этом поверхность трансплантата была более бледной, по сравнению с ней же после заживления через 15 дней, за исключением области вокруг

микровинтов, где отмечали более выраженное скопление микробного налета и некоторую отечность тканей, а также красно-фиолетовый цвет. Внешний вид областей с АСТТ был нормальным в сравнении с прилежащими тканями, при этом клинические признаки и цвет были одинаковыми. Поверхность была кератинизированной, и независимый эксперт, выполнявший оценку, не мог отличить эту область, не зная о проведенном лечении (рис. 4).

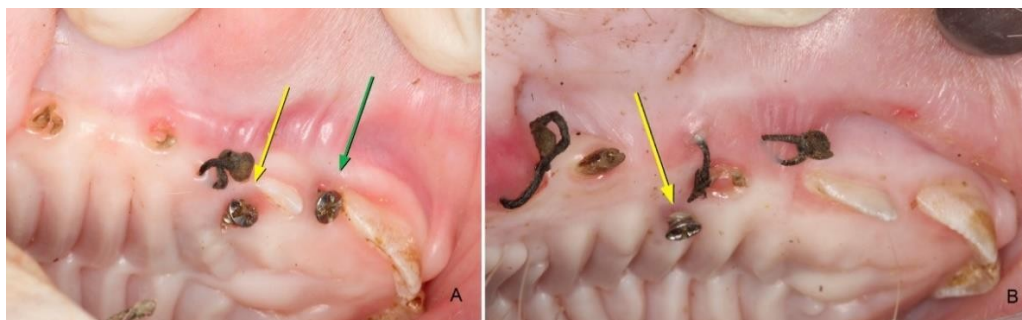


Рисунок 4. (А, В). Состояние трансплантата через 45 дней после хирургической установки. Желтыми стрелками отмечено место размещения АСТТ, зелеными стрелками — место размещения БДМ. Внешний вид областей размещения трансплантатов соответствовал клиническому заживлению по сравнению с прилежащими тканями, за исключением тканей вокруг винтов, которые характеризовались некоторой отечностью и более выраженным скоплением налета.

3.1.3. Через 90 дней

Структура и цвет областей применения БДМ клинически не отличались от прилежащих тканей. Внешний вид и цвет области, находящейся в прямом контакте с имплантированным микровинтом, были несколько иными, что могло быть вызвано воспалительной реакцией в связи с присутствием налета. Области применения АСТТ выглядели здоровыми, и их клинические характеристики соответствовали тем, которые наблюдались через 45 дней после хирургического вмешательства (рис. 5).

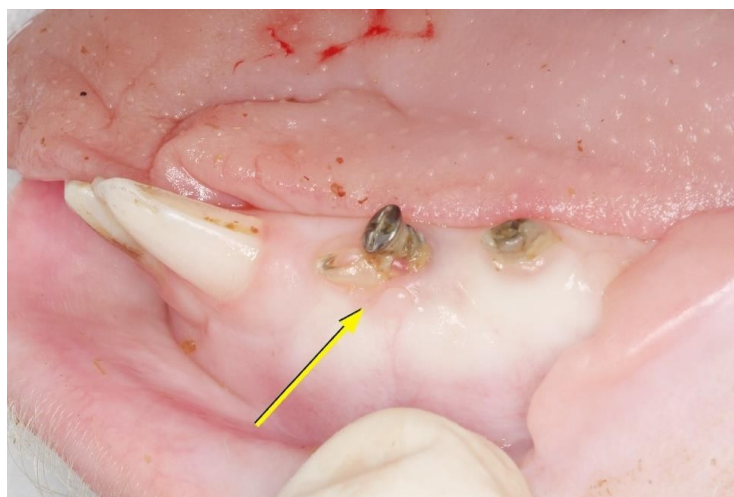


Рисунок 5. Состояние трансплантата через 90 дней после хирургической операции. Желтой стрелкой обозначено место размещения АСТТ.

Структура, цвет и контур ткани в области применения БДМ соответствовали таковым у прилежащих собственных тканей. Заметной или едва различимой линии разграничения, которая бы показала точное расположение и размер трансплантата в этой области, не наблюдали. Аналогичные эстетические результаты отмечали в областях, где применяли АСТТ.

3.2. Гистологическое исследование

3.2.1. Через 15 дней

В группе применения дермальной мембраны матрикс выявляли на соединительной ткани. Определяли первые клеточные слои незрелого эпителия, также отмечали кератинизацию и гиперплазию эпителия. В биоптатах, на которых применяли АСТТ, отмечали кератинизированный плоский эпителий, в значительной степени переплетенный с подлежащей соединительной тканью (рис. 6).

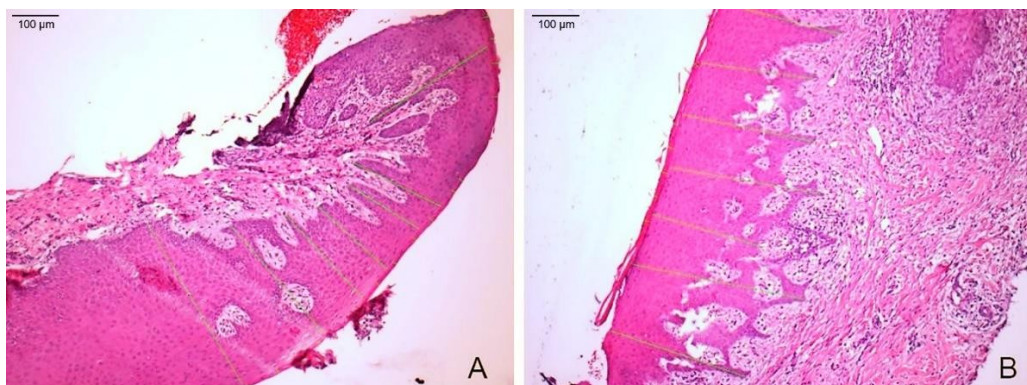


Рисунок 6. (А) Микрофотография образца области, на которой применяли бесклеточный дермальный матрикс свиного происхождения (100×). (В) Микрофотография образца области, на которой применяли аутологичный соединительнотканый трансплантат (100×). Расстояние от кератинового слоя до подлежащей соединительной ткани отмечено зелеными линиями.

3.2.2. Через 45 дней

В биоптатах областей, на которых применяли дермальную мембрану, наблюдалось полное заживление эпителия с образованием кератинизированного многослойного эпителия. В некоторых образцах в зоне замещения остатки исходных матриц были более заметными из-за процесса деградации. Визуализируется инфильтрация в области расположения кровеносных сосудов. В образцах, отобранных у животных из группы применения АКТГ, наблюдался ороговевший плоскоклеточный многослойный эпителий с нормальной периваскулярной инфильтрацией и незначительной инфильтрацией глубокой соединительной ткани (рис. 7).

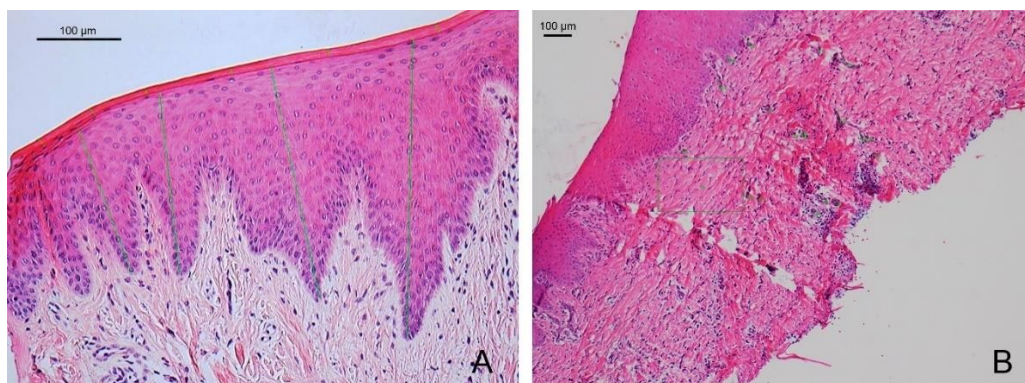


Рисунок 7. (А) Микрофотография области, на которой применяли бесклеточный дермальный матрикс, через 45 дней (200×). (В) Микрофотография области, на которой применяли аутологичный соединительнотканый трансплантат, через 45 дней (50×). Расстояние от кератинового слоя до подлежащей соединительной ткани отмечено зелеными линиями.

3.2.3. Через 90 дней

В биоптатах областей, на которых применяли дермальную мембрану (БДМ90), все участки характеризовались полным заживлением с признаками зрелой кератинизированной ткани многослойного плоского эпителия, возможно, несколько утолщенного, над которым наблюдали небольшую полосу плотного ортокератина. Слой подлежащей соединительной ткани характеризовался наличием правильно направленных толстых коллагеновых волокон и

нормальной васкуляризацией с типичной периваскулярной инфильтрацией. При анализе некоторых образцов были выявлены различные признаки, свидетельствующие о наличии остатков неабсорбированного исходного бесклеточного дермального матрикса. В случае применения АСТТ на образцах отмечали кератинизированный многослойный плоский эпителий, при этом в подлежащей соединительной ткани отмечали типичную легкую периваскулярную инфильтрацию. В 30 % образцов отмечали высокую степень воспалительной инфильтрации во внутренней части соединительной ткани, которая распространялась в сторону базального слоя по остальной ткани, с областями некроза, вызванного этой воспалительной инфильтрацией, и несколькими областями некроза и акантоза на эпителии. В частности, отмечали следующие явления: атрофия эпителия, короткие эпидермальные гребни, некроз приблизительно 10–20 % соединительной ткани, воспалительная инфильтрация, в зависимости от образца, около 5–10 % (рис. 8).

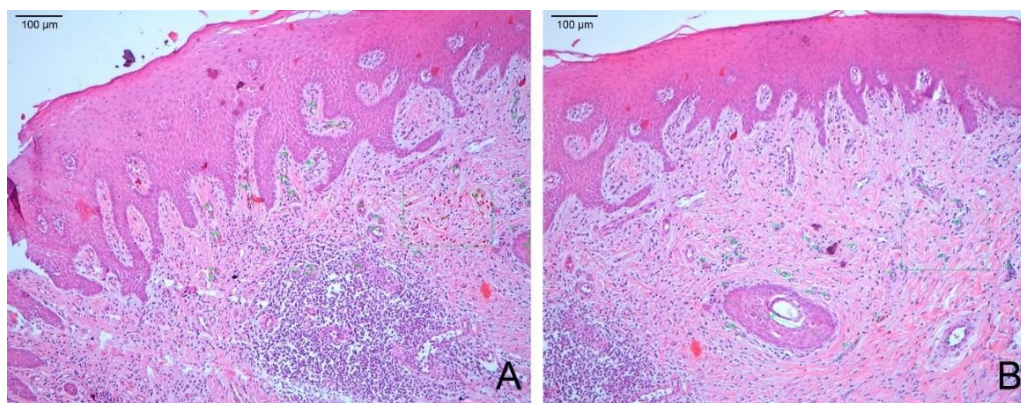


Рисунок 8. (А) Микрофотография образца области, на которой применяли бесклеточный дермальный матрикс, через 90 дней (100×). (В) Микрофотография образца области, на которой применяли аутологичный соединительнотканый трансплантат, через 90 дней (100×).

3.3. Толщина кератинового слоя и эпителиальной ткани

Во всех трех временных периодах, несмотря на постепенное уменьшение, средние значения толщины кератинового слоя в группе применения БДМ превышали таковые в группе применения АСТТ (рис. 8; дополнительная таблица S1). Что касается значений толщины эпителиальной ткани, через 15 дней в группах БДМ и АСТТ отмечали гиперплазию эпителия по сравнению с КГ. Эта тенденция сохранялась в группе БДМ, где были получены более высокие значения, чем в КГ и в группе АСТТ, через 90 дней (рис. 9; дополнительная таблица S2).

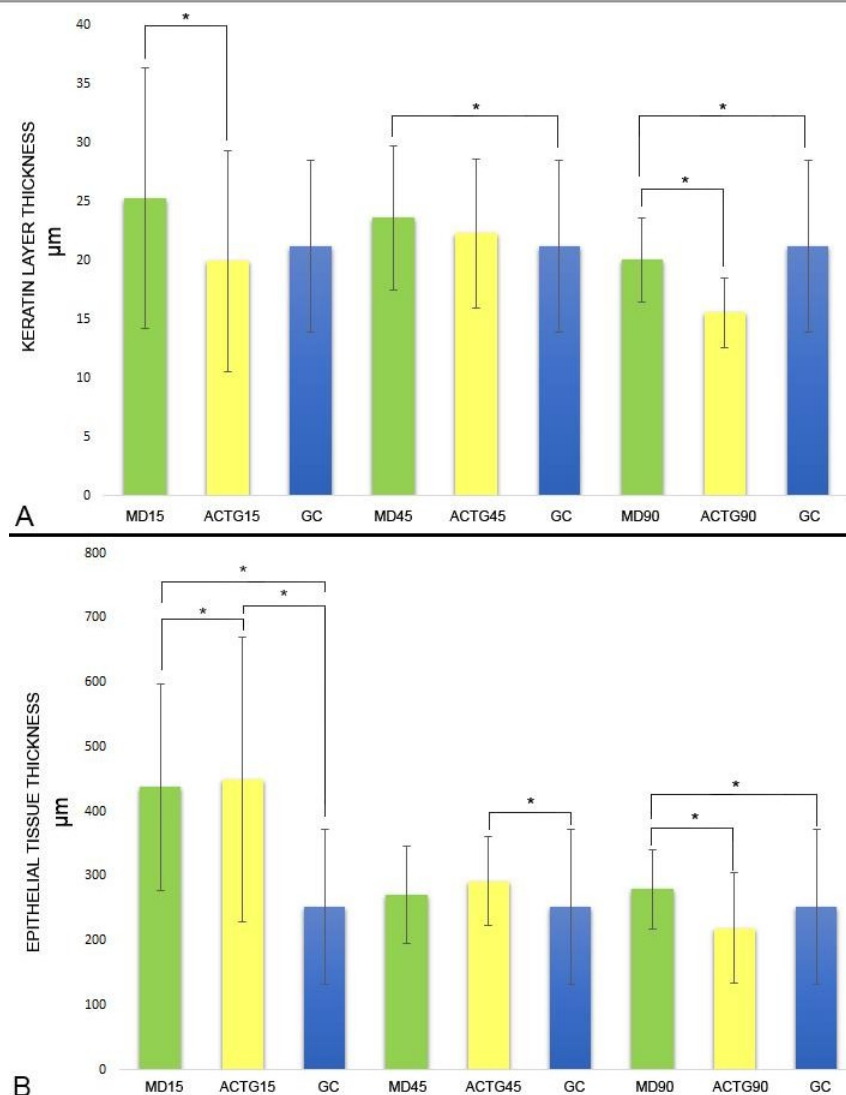


Рисунок 9. (А) Изменения значений толщины кератинового слоя с 15-го до 90-го дня.

(В) Изменения значений толщины эпителия с 15-го до 90-го дня. * При применении U-критерия Манна-Уитни были обнаружены существенные различия ($p < 0,001$) ($\alpha = 0,05$). БДМ15 — значения в группе БДМ через 15 дней; АСТТ15 — значения в группе АСТТ через 15 дней; БДМ45 — значения в группе БДМ через 45 дней; АСТТ45 — значения в группе АСТТ через 45 дней; БДМ90 — значения в группе БДМ через 90 дней; АСТТ90 — значения в группе АСТТ через 90 дней.

4. Обсуждение

Результаты аугментации десны отражают положительную роль данной процедуры в борьбе с налетом; повышении комфорта пациента; увеличении площади прилежащей десны в рамках терапевтической, ортодонтической или ортопедической стоматологии; а также помощь в профилактике рецессии десны со временем [23,28–30]. Согласно оценке, 2 мм кератинизированной ткани и 1 мм ткани, которую помещали вокруг зуба, наряду с борьбой с налетом, может предотвращать потерю имплантированной ткани и рецессию десны [23,28]. При необходимости увеличения кератинизированной десны применение бесклеточных дермальных коллагеновых матриц может рассматриваться как целесообразный метод, несмотря на ограниченное количество исследований [25]. По этой причине в настоящем исследовании оценивали толщину кератинового слоя и толщину эпителиальной ткани, полученной также после трансплантации бесклеточных матриц.

Гистологический анализ образцов показал, что через 15 дней толщина кератинового слоя в образцах с применением БДМ (25,27 мкм) была значительно больше, чем в группах АСТТ и КГ, а толщина эпителиальной ткани при применении БДМ была почти вдвое больше, чем в КГ ($437,50 \pm 159,4$ мкм против $251,60 \pm 120,40$ мкм) ($p < 0,001$). Эти данные сопоставимы с данными, Русу и соавт. [31], которые наблюдали увеличение кератинизированной ткани после применения коллагенового матрикса свиньи. Что касается кератинизированного эпителиального слоя, упоминается, что единственное различие между группами на этом этапе было на уровне эпителия, при этом на сформированной новой десне этот слой отсутствовал, однако эпителий был толще. В группе применения БДМ наблюдали неструктурированный эпителий с высокой инфильтрацией подлежащей соединительной ткани, в то время как в группе АСТТ наблюдали нормальный кератинизированный плоский эпителий, в значительной степени переплетенный с подлежащей соединительной тканью. В настоящем исследовании в группе АСТТ отмечали большой разброс уровней толщины эпителиальной ткани. Впрочем, это несоответствие могло быть вызвано методикой сбора данных и различиями в толщине донорской области по сравнению с хирургическими ложами.

Через 45 дней значения толщины кератина в группах БДМ и АСТТ уменьшилось, однако по-прежнему было выше, чем в КГ. Напротив, Шмитт и соавт. [24] сравнивали матрикс свиного коллагена (КМ) неустановленного производителя с АСТТ через 30 дней. Согласно полученным ими результатам, в группе КМ сокращение трансплантата было больше, чем в группе АСТТ, что значительно уменьшало ширину кератинизированной слизистой оболочки (18,46 % в группе КМ и 14,59 % в группе АСТТ). В настоящем исследовании при измерении толщины эпителиальной ткани средние значения в группе БДМ значительно уменьшились ($270,76 \pm 75,19$ мкм) относительно средних значений, полученных через 15 дней; впрочем, в группах АСТТ и БДМ полученные значения были значительно выше, чем в КГ. В обеих группах в изученных образцах отмечали полное заживление эпителия с формированием кератинизированного многослойного эпителия. С биологической точки зрения это может объяснять, почему все значения этой переменной оставались в пределах нормы. Однако мы не смогли найти исследования, в которых бы оценивали толщину эпителиальной ткани в этот период.

Через 90 дней в группе БДМ наблюдали кератинизированный многослойный плоский эпителий с плотной полосой ортокератина, толщина которого была аналогична таковой в КГ, несмотря на отсутствие статистической значимости, при этом в группе АСТТ он значительно уменьшался по сравнению с КГ. Эти результаты соответствуют данным, полученным Невинсом и соавт. [32], которые также через 90 дней отмечали наличие кератинизированного эпителия с небольшой плотной полосой ортокератинизации во всех образцах в областях применения внеклеточного матрикса, полученного из подслизистой оболочки тонкого кишечника свиньи. Аналогичным образом, согласно гистологическим данным из исследования Шмитт и соавт. [24], в группе применения коллагенового матрикса свиньи и в группе применения АСТТ наблюдали многослойный кератинизированный плоский эпителий с аналогичным профилем экспрессии кератина в обеих группах.

Через 90 дней в группе БДМ толщина эпителия была больше ($281,49 \pm 63,67$ мкм). Наблюдались статистически значимые различия с группой КГ ($251,60 \pm 10,6$ мкм) ($p < 0,001$). Значительное увеличение толщины эпителия также наблюдалось в группе БДМ по сравнению со значениями, полученными через 45 дней после хирургического вмешательства ($270,76 \pm 7,11$ мкм) ($p = 0,023$). В группе применения АСТТ толщина эпителия уменьшилась по сравнению с результатами измерения, проведенного через 45 дней после хирургического вмешательства ($292,02 \pm 7,13$ мкм < $219,71 \pm 5,98$ мкм). Уменьшение наблюдалось до достижения меньших значений, чем в КГ. Мато и соавт. [33] также отмечали увеличение толщины эпителия через 6 и 12 месяцев в областях применения бесклеточного дермального матрикса и аутологичного

соединительнотканного трансплантата. Впрочем, итоговая толщина была значительно большей в областях применения аутологичного соединительнотканного трансплантата в качестве контрольной группы ($0,9 \pm 0,2 \text{ мм} < 2,1 \pm 0,2 \text{ мм}$) ($p < 0,01$), по сравнению с областями применения БДМ ($0,3 \pm 0,2 \text{ мм} < 1,4 \pm 0,3 \text{ мм}$). Данные настоящего исследования также сопоставимы с результатами, полученными Невинсом и соавт. [32], согласно которым средняя толщина эпителия составляла $294 \pm 17,9 \text{ мкм}$ через 13 недель у 6 пациентов, у которых применяли матрикс, полученный из подслизистой оболочки тонкого кишечника свиньи. Эти результаты, полученные для исследуемого матрикса, были аналогичны данным нашего исследования, где в группе БДМ90 средняя толщина эпителия составляла $281,49 \text{ мкм}$.

Данные нашего исследования отличаются от результатов, полученных Вей и соавт. [21], которые проводили клиническое и гистологическое сравнение бесклеточного дермального матрикса (БДМ) неустановленного производителя и АСТТ путем помещения матрикса в ротовую полость для получения кератинизированной ткани. Они отмечали менее эффективный и прогнозируемый результат в аспекте увеличения матрикса ($2,59 \pm 0,92 \text{ мм}$), по сравнению с АСТТ ($5,57 \pm 0,44$) в связи с чрезмерным сокращением трансплантата. Шмитт и соавт. [24] также отмечали несколько большее уменьшение коллагенового матрикса свиньи (7,35 %) по сравнению с группой АСТТ (7,11 %) через 90 дней, как и Харрис и соавт. [34], которые наблюдали увеличение зоны кератинизированной десны через 3 месяца на 4,8 мм в группе АСТТ и на 4,7 мм в группе применения бесклеточного дермального матрикса [35]. При анализе некоторых образцов мы обнаружили различные признаки, свидетельствующие о наличии остатков неабсорбированного исходного бесклеточного дермального матрикса. Таким образом, необходимы дальнейшие более продолжительные исследования, в которых будет изучен биологический эффект этого вмешательства.

Одна из трудностей настоящего исследования связана со стандартизацией размеров трансплантата. Несмотря на то, что бесклеточный дермальный матрикс всегда имеет одну и ту же толщину, даже при выполнении манипуляций одним специалистом, ручной отбор аутологичного трансплантата может все же привести к различиям в используемых образцах, что влияет на параметры толщины. С учетом этих ограничений по истечении 3 месяцев в этом исследовании с использованием свиней в качестве модели группа БДМ превосходила группу АСТТ по показателям толщины кератинового слоя и эпителиальной ткани. Принимая во внимание частоту появления осложнений и ограниченную доступность методик аутоотрансплантации, использование этого ксеногенного материала может служить разумной альтернативой. В настоящее время применить аналогичный дизайн в исследовании с участием людей невозможно из этических соображений. Следовательно, дальнейшие исследования на различных животных моделях могут помочь раскрыть биологические эффекты этого метода регенерации.

Дополнительные материалы: доступны онлайн по ссылке <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/2/272/s1>, Таблица S1. Толщина кератинового слоя в образцах, обработанных бесклеточным дермальным матриксом и субэпителиальной аутогенной соединительной тканью, по сравнению с контрольной тканью, Таблица S2. Толщина эпителиальной ткани в образцах, обработанных бесклеточным дермальным матриксом и субэпителиальной аутогенной соединительной тканью, по сравнению с контрольной тканью.

Участие авторов: концепция, J.A. и J.M.A.; методология, J.M.A.; проверка, J.A. и C.R.; анализ, J.A.; исследование, J.M.A.; ресурсы, J.M.A.; курирование данных, J.A., A.S., и J.M.A.; подготовка черновика, J.A., J.M.A., и A.S.; редактирование, J.A., A.S., C.R., и J.M.A.; контроль, J.A. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: это исследование не получило внешнего финансирования.

Заявление институционального наблюдательного совета: протокол исследования был одобрен Комитетом по этике и благополучию животных Университетской больницы Пуэрта-де-Йерро, Махадаонда, Испания. Процедуры проводились в соответствии с европейскими (Directive 2010.63.EU) и испанскими (RD 53/2013) правилами обращения с экспериментальными животными и ухода за ними.

Заявление об информированном согласии: не применимо.

Заявление о доступности данных: данные, представленные в этом исследовании, доступны по запросу от соответствующего автора после получения разрешения уполномоченного лица.

Благодарности: Angel Sánchez: анализ и интерпретация данных.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Sanz, M.; Lorenzo, R.; Aranda, J.J.; Martin, C.; Orsini, M. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prothetic restorations: A randomized prospective clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* **2009**, *36*, 868–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Cairo, F. Periodontal plastic surgery of gingival recessions at single and multiple teeth. *Periodontology 2000.* **2017**, *75*, 296–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sculean, A.; Mihatovic, I.; Shirakata, Y.; Bosshardt, D.D.; Schwarz, F.; Iglhaut, G. Healing of localized gingival recessions treated with coronally advanced flap alone or combined with either a resorbable collagen matrix or subepithelial connective tissue graft. A preclinical study. *Clin. Oral Investig.* **2015**, *19*, 903–909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cairo, F.; Pagliaro, U.; Nieri, M. Treatment of gingival recession with coronally advanced flap procedures: A systematic review. *J. Clin. Periodontol.* **2008**, *35*, 136–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Balderrama, D.; Ferreira, R.; Rezende, D.R.; Nogueira, A.L.; Zangrando, M.S. Root coverage stability with acellular dermal matrix in multiple gingival recessions in esthetic zone: A clinical report with 12-year follow-up. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2019**, *23*, 584–588. [[CrossRef](#)]
6. Aguirre-Zorzano, L.A.; García-De La Fuente, A.M.; Estefanía-Fresco, R.; Marichalar-Mendía, X. Complications of harvesting a connective tissue graft from the palate. A retrospective study and description of a new technique. *J. Clin. Exp. Dent.* **2017**, *9*, e1439–e1445. [[CrossRef](#)]
7. Harris, R.J. Root coverage with a connective tissue with partial thickness double pedicle graft and an acellular dermal matrix graft: A clinical and histological evaluation of a case report. *J. Periodontol.* **1998**, *69*, 1305–1311. [[CrossRef](#)]
8. Mao, E.J. The applications of periodontal gingival surgery. II: Alternative materials. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **2018**, *36*, 117–122.
9. Cevallos, C.A.R.; de Resende, D.R.B.; Damante, C.A.; Sant’Ana, A.C.P.; De Rezende, M.L.R.; Gregghi, S.L.A.; Zangrando, M.S.R. Free gingival graft and acellular dermal matrix for gingival augmentation: A 15-year clinical study. *Clin. Oral Investig.* **2020**, *24*, 1197–1203. [[CrossRef](#)]
10. Ahmedbeyli, C.; Ipci, S.D.; Cakar, G.; Yilmaz, S. Laterally positioned flap along with acellular dermal matrix graft in the management of maxillary localized recessions. *Clin. Oral Investig.* **2019**, *23*, 595–601. [[CrossRef](#)]
11. Chambrone, L.; Ortega, M.A.S.; Sukekava, F.; Rotundo, R.; Kalemaj, Z.; Buti, J.; Prato, G.P.P.; Zamira, K. Root coverage procedures for treating localised and multiple recession-type defects. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *10*, CD007161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Sanz-Martín, I.; Encalada, C.; Sanz-Sánchez, I.; Aracil, J.; Sanz, M. Soft tissue augmentation at immediate implants using a novel xenogeneic collagen matrix in conjunction with immediate provisional restorations: A prospective case series. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2019**, *21*, 145–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Heidari, M.; Paknejad, M.; Jamali, R.; Nokhbatolfoghahaei, H.; Fekrazad, R.; Moslemi, N. Effect of laser photobiomodulation on wound healing and postoperative pain following free gingival graft: A split-mouth triple-blind randomized controlled clinical trial. *J. Photochem. Photobiol. B* **2017**, *172*, 109–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sebaoun, A.; Nemcovsky, C.E.; Beitlitum, I.; Moses, O. Modified Tunnel Double Papilla Procedure for Root Coverage in the Anterior Mandible. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2019**, *39*, 503–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Scheyer, E.T.; Nevins, M.L.; Neiva, R.; Cochran, D.L.; Giannobile, W.V.; Woo, S.-B.; King, W.N.; Spitznagel, J.K.; Bates, D.; McGuire, M.K. Generation of site-appropriate tissue by a living cellular sheet in the treatment of mucogingival defects. *J. Periodontol.* **2014**, *85*, e57–e64. [[CrossRef](#)]
16. McGuire, M.K.; Scheyer, E.T.; Nunn, M.E.; Lavin, P.T. A pilot study to evaluate a tissue engineered bi-layered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *J. Periodontol.* **2008**, *79*, 1847–1856. [[CrossRef](#)]
17. McGuire, M.K.; Scheyer, E.T.; Nevins, M.L.; Neiva, R.; Cochran, D.L.; Mellonig, J.T.; Giannobile, W.V.; Bates, D. Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva: Results from a randomized, withinpatient, controlled trial. *J. Periodontol.* **2011**, *82*, 1414–1423. [[CrossRef](#)]
18. Nevins, M.L. Tissue-engineered bilayered cell therapy for the treatment of oral mucosal defects: A case series. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2010**, *30*, 31–39.
19. Dragan, I.F.; Hotlzman, L.P.; Karimbux, N.Y.; Morin, R.A.; Bassir, S.H. Clinical Outcomes of Comparing Soft Tissue Alternatives to Free Gingival Graft: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Evid. Based Dent. Pract.* **2017**, *17*, 370–380.e3. [[CrossRef](#)]
20. Pabst, A.M.; Happe, A.; Callaway, A.; Ziebart, T.; Stratul, S.I.; Ackerman, M.; Konerding, M.A.; Willershausen, B.; Kasaj, A. In vitro and in vivo characterization of porcine acellular dermal matrix for gingival augmentation procedures. *J. Periodontol. Res.* **2013**, *49*, 371–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Wei, P.; Laurell, L.; Geivelis, M.; Lingen, M.; Maddalozzo, D. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. *J. Periodontol.* **2000**, *71*, 1297–1305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yogini, M.; Prabhuji, M.L.V.; Karthikeyan, B.V.; Sai Jyothsna, N. Comparison of Extracellular Matrix Membrane and Connective Tissue Graft for Root Coverage in Class I/II Gingival Recession Defects: A Split Mouth Study. *J. Int. Acad. Periodontol.* **2016**, *18*, 36–44.
23. Kim, D.M.; Neiva, R. Periodontal Soft Tissue Non-Root Coverage Procedures: A Systematic Review From the AAP Regeneration Workshop Title. *J. Periodontol.* **2015**, *86*, S56–S72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Schmitt, C.M.; Tudor, C.; Kiener, K.; Wehrhan, F.; Schmitt, J.; Eitner, S.; Agaimy, A.; Schlegel, K.A. Vestibuloplasty; porcine collagen matrix versus free gingival graft: A clinical and histologic study. *J. Periodontol.* **2013**, *84*, 914–923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Suárez-López Del Amo, F.; Rodriguez, J.C.; Asa’ad, F.; Wang, H.L. Comparison of two soft tissue substitutes for the treatment of gingival recession defects: An animal histological study. *J. Appl. Oral Sci.* **2019**, *27*, e20180584. [[CrossRef](#)]
26. De Resende, D.R.B.; Gregghi, S.L.A.; Siqueira, A.F.; Benfatti, C.A.M.; Damante, C.A.; Raghianti Zangrando, M.S. Acellular dermal matrix allograft versus free gingival graft: A histological evaluation

- and split-mouth randomized clinical trial. *Clin. Oral Investig.* **2019**, *23*, 539–550. [[CrossRef](#)]
27. Kantarci, A.; Hasturk, H.; Van Dyke, T.E. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontology 2000.* **2015**, *68*, 66–82. [[CrossRef](#)]
 28. Scheyer, E.T.; Sanz, M.; Dibart, S.; Greenwell, H.; John, V.; Kim, D.M.; Langer, L.; Neiva, R.; Rasperini, G. Periodontal Soft Tissue Non-Root Coverage Procedures: A Consensus Report From the AAP Regeneration Workshop. *J. Periodontol.* **2015**, *86*, S73–S76. [[CrossRef](#)]
 29. Agudio, G.; Nieri, M.; Rotundo, R.; Cortellini, P.P.P.G. Free gingival grafts to increase keratinized tissue: A retrospective long-term evaluation (10 to 25 years) of outcomes. *J. Periodontol.* **2008**, *79*, 587–594. [[CrossRef](#)]
 30. Agudio, G.; Nieri, M.; Rotundo, R.; Franceschi, D.; Cortellini, P.; Pini Prato, G.P. Periodontal conditions of sites treated with gingival-augmentation surgery compared to untreated contralateral homologous sites: A 10- to 27-year long-term study. *J. Periodontol.* **2009**, *80*, 1399–1405. [[CrossRef](#)]
 31. Rusu, D.; Stratul, M.S.S.; Festila, M.S.D.; Surlin, P.; Kasaj, A. Histology and surface ultrastructure during early healing after gingival augmentation with a three- dimensional collagen matrix: A report of six cases. *Quintessence Int.* **2017**, *48*, 57–67. [[PubMed](#)]
 32. Nevins, M.; Nevins, M.L.; Camelo, M.; Camelo, J.M.; Schupbach, P.; Kim, D.M. The clinical efficacy of DynaMatrix extracellular membrane in augmenting keratinized tissue. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2010**, *30*, 151–161.
 33. Matoh, U.; Petelin, M.; Gašperšič, R. Split-Mouth Comparison of Coronally Advanced Flap with Connective Tissue Graft or Collagen Matrix for Treatment of Isolated Gingival Recessions. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2019**, *39*, 439–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 34. Harris, R.J. Clinical evaluation of 3 techniques to augment keratinized tissue without root coverage. *J. Periodontol.* **2001**, *72*, 932–938. [[CrossRef](#)]
 35. Cieslik-Wegemund, M.; Wierucka-Młynarczyk, B.; Tanasiewicz, M.; Gilowski, Ł. Tunnel Technique with Collagen Matrix Compared With Connective Tissue Graft for Treatment of Periodontal Recession: A Randomized Clinical Trial. *J. Periodontol.* **2016**, *87*, 1436–1443. [[CrossRef](#)]