

# ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА НА ФРАКЦИОННЫЙ ЛАЗЕРНЫЙ ФОТОТЕРМОЛИЗ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЖИВОТНЫХ

УДК 616.31.001.6–018.73:615.83

Поступила 14.04.2012 г.



**Н.Д. Гладкова**, д.м.н., профессор, руководитель проблемной научной группы оптической когерентной томографии НИИ ПФМ<sup>1</sup>;

**Ф.И. Фельдштейн**, к.ф.-м.н., вице-президент<sup>2</sup>;

**М.М. Карабут**, аспирант кафедры биофизики<sup>3</sup>;

**Ю.В. Островская**, к.м.н., ассистент кафедры стоматологии ФПКВ<sup>1</sup>;

**Л.Б. Снопина**, д.б.н., зав. отделом морфологии ЦНИЛ НИИ ПФМ<sup>1</sup>;

**Е.Б. Киселева**, младший научный сотрудник проблемной научной группы оптической когерентной томографии НИИ ПФМ<sup>1</sup>;

**Г.Е. Романос**, доктор стоматологической хирургии, профессор, директор отделения лазерной стоматологии Эстмановского стоматологического института<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

<sup>2</sup>Dental Photonics Inc., Уолпол, США, 1600, Boston-Providence Highway;

<sup>3</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского —

Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

<sup>4</sup>Университет Рочестера, Рочестер, США, 14627, Elmwood Avenue, 625

**Цель исследования** — подтвердить предположение, что лазерная обработка десны методом фракционного лазерного фототермолиза способна инициировать регенерацию ее тканей за счет стимуляции образования фибробластов, роста нового коллагена, сосудистых структур и завершается полным заживлением десны.

**Материалы и методы.** Использована оригинальная лазерная система компании Dental Photonics Inc. на основе диодного лазера с длиной волны 980 нм, генерирующего излучение мощностью до 20 Вт для проведения фракционного лазерного фототермолиза. Каждая колонка микрокоагуляции создавалась при длительности экспозиции 80, 120 или 150 мс. Эксперименты проведены на 18 здоровых кроликах. Животные прижизненно подвергались лазерной обработке, затем наблюдались в течение 90 сут.

**Результаты.** Установлено, что однократная процедура фракционного лазерного фототермолиза с длиной волны 980 нм и оптимальной длительностью импульса 150 мс индуцирует регенерацию слизистой оболочки полости рта до структуры здоровой ткани. Новая ткань в процессе заживления отличается повышенным кровоснабжением и концентрацией фибробластов без признаков фиброза.

**Заключение.** Полученные данные позволяют рассматривать фракционный лазерный фототермолиз в качестве перспективного метода лечения заболеваний мягких тканей полости рта.

**Ключевые слова:** слизистая оболочка полости рта, фракционный лазерный фототермолиз, ФЛФ, регенерация.

## English

## Histological response of oral mucosa on fractional laser photothermolysis in animal experiments

**N.D. Gladkova**, D.Med.Sc., Professor, Head of Task Research Group of Optic Coherence Tomography, Scientific Research Institute of Applied Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

Для контактов: Гладкова Наталья Дороевна, тел. раб. 8(831)465-41-13, тел. моб. +7 951-910-66-57; e-mail: natalia.gladkova@gmail.com

**F.I. Feldstein**, PhD, Vice-president<sup>2</sup>;

**M.M. Karabut**, Postgraduate, the Department of Biophysics<sup>3</sup>;

**Y.V. Ostrovskaya**, PhD, Tutor, the Department of Dentistry, the Faculty of Doctors' Advanced Training<sup>1</sup>;

**L.B. Snopova**, D.Bio.Sc., Head of the Morphology Department, Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**E.B. Kiseleva**, Junior Research Worker, Task Research Group of Optic Coherence Tomography, Scientific Research Institute of Applied Fundamental Medicine<sup>1</sup>;

**G.E. Romanos**, DDS, PhD, Professor, Dr.Med.Dent., Eastman Institute for Oral Health<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

<sup>2</sup>Dental Photonics Inc., Boston-Providence Highway, Walpole, USA, 1600;

<sup>3</sup>Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

<sup>4</sup>University of Rochester, Elmwood Avenue, 625, Rochester, USA, 14627

**The aim of the investigation** is to prove the supposition that gingival treated by fractional laser photothermolysis is able to initiate regeneration of gingival tissues due to the stimulation of fibroblasts formation, new collagen and vascular structure growth, and complete gingival healing.

**Materials and methods.** There has been used an original laser system of "Dental Photonics" based on diode laser with wave length of 980 nm generating radiation, with radiation power being up to 20 Watt to perform fractional laser photothermolysis. Each column of microcoagulation was formed in exposure time of 80, 120 or 150 ms. The experiments have been carried out on 18 healthy rabbits. The animals have undergone in vivo laser treatment, and then have been followed up within 90 days.

**Results.** A single fractional laser photothermolysis procedure with wave length of 980 nm and optimal pulse length of 150 ms was found to induce oral mucosa regeneration till health tissue structure. In healing process, new tissue is characterized by increased blood supply and fibroblasts concentration with no fibrosis signs.

**Conclusion.** The obtained data enable to consider fractional laser photothermolysis as prospective technique of the treatment of oral soft tissue diseases.

**Key words:** oral mucosa, fractional laser photothermolysis, FLPh, regeneration.

Стимуляция регенерации периодонтальных мягких тканей является важнейшей задачей терапии заболеваний слизистой оболочки полости рта. В данной работе для инициации регенерации десны и слизистой оболочки полости рта был использован минимально инвазивный микрохирургический подход на основе фракционного лазерного фототермолиза (ФЛФ) [1, 2]. Микроскопические термические раны в виде островков повреждения, окруженных нормальной жизнеспособной тканью, способствуют стимуляции регенерации, которая приводит к полному восстановлению ткани без образования рубца. ФЛФ успешно используется для омоложения кожи, лечения разнообразных заболеваний кожи и сетчатки глаза [3]. Установлено, что заживление кожи без рубцевания происходит даже в том случае, если площадь термического повреждения превышает 25% необработанной поверхности [4]. Данный метод приобрел большую популярность ввиду низкого уровня повреждения ткани, незначительных побочных эффектов и высокой действенности процедуры.

Подобный вид лазерной обработки никогда не применялся по отношению к мягким тканям полости рта, в то время как десневая рецессия, пародонтит и гингивит — часто встречающиеся заболевания, представляющие реальную проблему для практикующих дантистов и ухудшающие качество жизни пациентов. Высокая васкуляризация и интенсивный метаболизм десны способствуют ее более быстрому заживлению и восстановлению по сравнению с кожей [5].

**Цель исследования** — подтвердить предположение, что лазерная обработка десны методом фракционного

лазерного фототермолиза способна инициировать регенерацию ее тканей за счет стимуляции образования фибробластов, роста нового коллагена, сосудистых структур и завершается полным заживлением десны.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводились на 18 здоровых кроликах (16 самцов в возрасте 6–8 мес и 2 самки в возрасте 5 мес). Животные прижизненно подвергались лазерной обработке, затем наблюдались в течение 90 сут. В работе использована оригинальная лазерная система компании Dental Photonics Inc. на основе диодного лазера с длиной волны 980 нм, генерирующего излучение мощностью до 20 Вт. Каждая колонка создавалась при контакте наконечника диаметром 400 мкм с тканью десны (длительность экспозиции — 80, 120 и 150 мс). Предварительные лабораторные эксперименты по формированию колонок в мягких тканях *ex vivo* показали, что максимальное аспектное отношение колонок (отношение глубины повреждения к поперечному размеру) достигается при длительности импульса 150 мс. При дальнейшем увеличении длительности импульса поперечный размер растет быстрее, чем глубина, понижая тем самым аспектное отношение.

Лазерные колонки наносились рядами (обычно 2–3 колонки в ряду) на верхнюю челюсть кролика в области резцов (рис. 1). Для каждой длительности импульса создавались как минимум 2 колонки. После выведения животного из эксперимента область первой колонки фиксировалась в 10% растворе нейтрального формалина, заливалась в парафин, после чего готовились серийные срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивались



**Рис. 1.** Внешний вид лазерных колонок на десне верхней челюсти кролика

гематоксилином и эозином для определения общего состояния ткани. Из нефиксированной ткани десны, содержащей вторую колонку, готовили криостатные срезы и окрашивали нитросиним тетразолием для определения жизнеспособности ткани.

До проведения лазерной обработки животных анестезировали внутримышечно миорелаксантом Рометар в дозе 3 мг/кг. Забор материала осуществляли через 1 ч, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 28 и 90 сут после обработки, при этом животные подвергались эвтаназии путем введения 100 мг/кг Золетила 50.

При проведении исследования неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.).

**Результаты.** Зоны лазерного разрушения наблюдались на гистологических препаратах двух типов окрашивания. Эффект непосредственного лазерного воздействия на ткань отчетливее идентифицировался

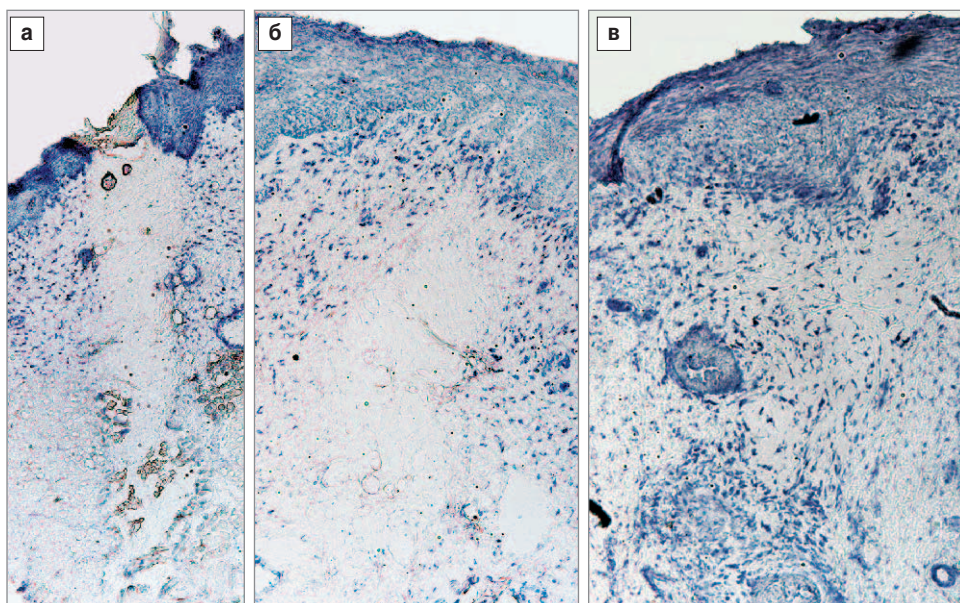
на препаратах, окрашенных нитросиним тетразолием. Колонка визуализировалась как зона теплового повреждения эпителия и подслизистого слоя, лишенная жизнеспособности. Окраска нитросиним тетразолием фиксирует торможение ферментативной окислительной активности, что позволяет с высокой точностью измерить размер колонки. Ширина колонок варьировала от 0,4 до 0,7 мм, а глубина — от 1,2 до 1,8 мм, достигая максимума при длительности импульса 150 мс (рис. 2, а).

На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, непосредственно после воздействия при всех длительностях импульса (80–150 мс) эпителий был разрушен, коллаген полностью дезорганизован, никаких признаков жизнеспособности ткани в области колонок не наблюдалось.

Как известно, заживление резаных ран проходит через последовательные перекрывающиеся стадии: воспаления, пролиферации и регенерации [6]. Заживление лазерного повреждения протекает через такие же фазы [7].

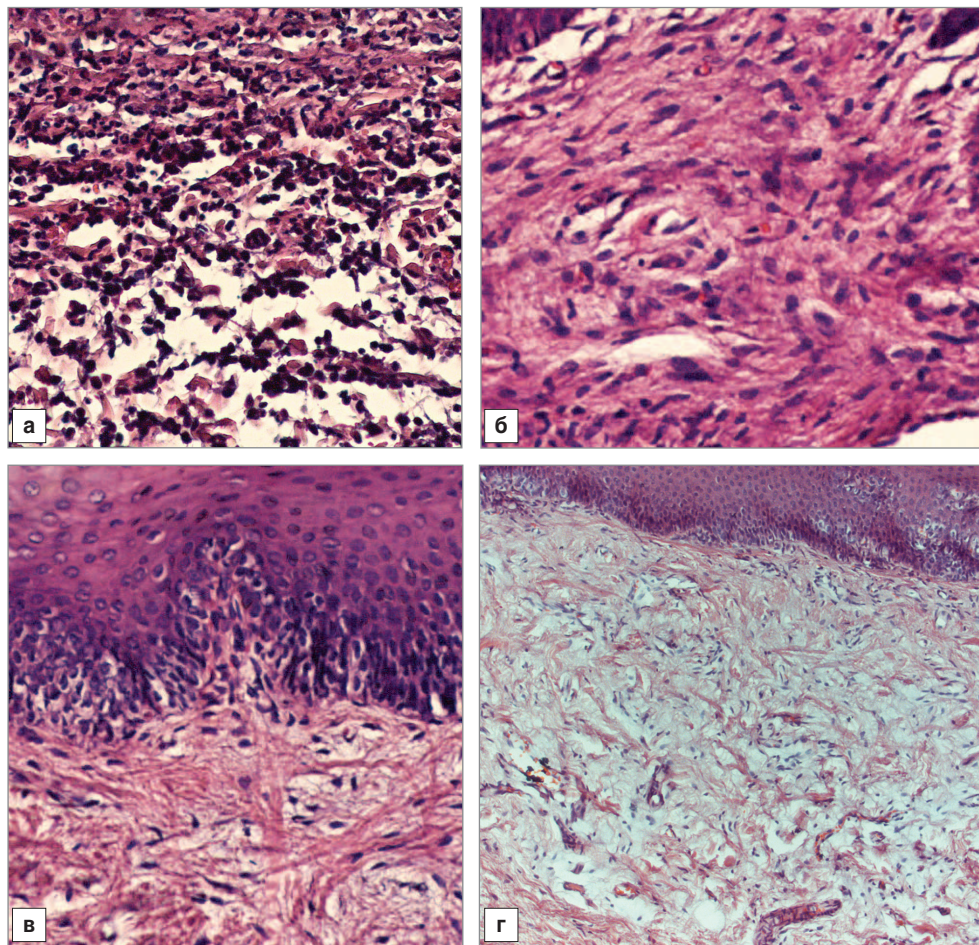
**Воспалительная фаза заживления.** Через 1 сут после воздействия при всех длительностях лазерного импульса (80–150 мс) начинается воспалительная фаза заживления. Массивность воспалительного клеточного инфильтрата, который усиливает дезорганизацию поврежденного коллагена, пропорциональна длительности лазерного импульса, т.е. через 1 сут после воздействия максимальное количество нейтрофилов наблюдается при длительности импульса 150 мс (рис. 3, а). Максимум воспалительной клеточной активности отмечается на 2–4-е сутки, после чего интенсивность клеточной инфильтрации медленно снижается и возвращается к исходному уровню на 12-е сутки наблюдения. На 28-е сутки клеточная инфильтрация отсутствует, однако все еще сохраняется небольшой отек стромы. К 90-м суткам признаков воспаления не наблюдается.

**Пролиферативная фаза заживления.** Первые признаки регенерации эпителия, такие как базальнокле-



**Рис. 2.** Потеря жизнеспособности ткани в области лазерной колонки и ее восстановление после однократной процедуры фракционного лазерного фототермолиза с длительностью импульса 150 мс: а — через 1 ч после воздействия; б — через 1 сут после воздействия; в — через 7 сут после воздействия. Окраска — нитросиним тетразолием. Размер колонки на рис. а — 0,5х1,3 мм; размер изображений — 0,95х1,6 мм





**Рис. 3.** Заживление лазерной колонки после однократной процедуры фракционного лазерного фототермолиза с длительностью импульса 150 мс: *а* — через 1 сут после воздействия (фаза инфильтрации — массивный воспалительный клеточный инфильтрат); *б* — через 5 сут после воздействия (фаза пролиферации — активация фибробластов и образование тонкостенных кровеносных сосудов); *в* — через 12 сут после воздействия (фаза пролиферации и регенерации — новый эпителий и молодые коллагеновые волокна; их ориентация в субэпителиальном слое еще не имеет упорядоченной горизонтальной структуры); *г* — через 90 сут после воздействия (регенерационная фаза заживления — коллаген полностью сформирован). Окраска — гематоксилином и эозином. Размер изображений — 0,30х0,30 мм

точная активность и инвагинация эпителия в область колонки, выявляются уже через 2 сут после воздействия при всех длительностях лазерного импульса. Такие данные позволяют говорить о минимальном риске заражения, появления различного вида выделений или макроскопических корок при использовании ФЛФ в качестве метода лечения. На 5–7-е сутки наблюдается реактивная гипертрофия эпителия, которая свидетельствует о быстрой пролиферации базального и шиповатого слоев эпителия. К 12-м суткам при 150 мс формируется новый эпителий (рис. 3, *в*) с признаками пара- и гиперкератоза. В ходе гистологического исследования выявлена повышенная функциональная активность эпителиальных клеток, в том числе интенсивный синтез кератогиалина и кератина, в результате чего и мог появиться пара- и гиперкератоз. Кроме того, на 7–12-е сутки после воздействия в новом эпителии отмечаются слабовыраженные признаки дискератоза и спонгиоза. Новый эпителий полностью формируется на 28-е сутки после воздействия. Регенерация соединительной ткани

начинается с повышенной пролиферации фибробластов, участвующих в производстве нового коллагена и формировании сети новых тонкостенных кровеносных сосудов: при длительности 80 мс — на 3-и сутки после воздействия, при 120 мс — на 4-е сутки, при 150 мс — на 5-е сутки (рис. 3, *б*). На 12-е сутки новый коллаген формируется на всех уровнях структурной организации, однако его ориентация в субэпителиальном слое еще не имеет упорядоченной горизонтальной структуры (рис. 3, *в*). При этом молодая соединительная ткань содержит вновь образованные тонкостенные кровеносные сосуды.

*Регенерационная фаза заживления.* На 12-е и даже на 28-е сутки после лазерного воздействия при 150 мс коллагеновые волокна, расположенные непосредственно под эпителием, все еще не имеют регулярной ориентации (рис. 3, *в*), соответствующей состоянию до лазерного воздействия. Однако на 90-е сутки коллаген соединительной ткани оказывается полностью сформированным (рис. 3, *г*).

Таким образом, полученные данные убедительно свидетельствуют, что на 28-е сутки наблюдения структура ткани после однократной процедуры ФЛФ почти полностью восстанавливается, и хотя отмечается небольшое увеличение числа мелких сосудов в субэпителиальном слое и незначительный отек, никаких признаков рубцевания при этом не обнаруживается. На 90-е сутки структура ткани полностью восстанавливается: признаков дискератоза и спонгиоза в эпителии, а также признаков рубцевания в соединительной ткани не обнаруживается. Понимание механизмов и анализ продолжительности заживления ткани после лазерного воздействия позволяют утверждать, что повторную фракционную обработку целесообразно проводить не ранее чем через 1 нед после первой процедуры во избежание осложнений, связанных с неполным заживлением эпителия и соединительной ткани [8].

**Заключение.** Однократная фракционная обработка лазерным фототермолизом индуцирует регенерацию слизистой оболочки полости рта, что позволяет рассматривать этот метод в качестве перспективного способа лечения заболеваний мягких тканей полости рта.

Работа поддержана Государственными контрактами ФЦП Минобрнауки России №02.740.11.5149 и

№4.740.11.1188, грантом РФФИ №10-02-01175 и грантом Правительства Российской Федерации (договор №11. G34.31.0017). Авторы выражают благодарность компании *Dental Photonics Inc.* за предоставленную лазерную установку.

#### Литература/References

1. Altshuler G., Smirnov M., Yaroslavsky I. et al. Lattice of optical islets: a novel treatment modality in photomedicine. *Journal of Physics D (Applied Physics)* 2005; 38(15): 2732–2747.
2. Manstein D., Herron G.S., Sink R.K. et al. Fractional photothermolysis: a new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury. *Lasers Surg Med* 2004; 34(5): 426–438.
3. Moretti M. *Fractional skin rejuvenation: a major new technology category*. Medical Insight, Inc.; 2008.
4. Bedi V.P., Chan K.F., Sink R.K. et al. The effects of pulse energy variations on the dimensions of microscopic thermal treatment zones in nonablative fractional resurfacing. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 145–155.
5. Szpaderska A.M., Zuckerman J.D., DiPietro L.A. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res* 2003; 82: 621–626.
6. Jih M.H., Goldberg L.H., Kimyai-Asadi A. Fractional photothermolysis for photoaging of hands. *Dermatol Surg* 2008 Jan; 34(1): 73–78.
7. Laubach H.-J., Tannous Z., Anderson R.R. et al. Skin responses to fractional photothermolysis. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 142–149.
8. Baranoski S., Ayello E.A. *Wound care essentials: practice principles*. Philadelphia, PA–London: Lippincott Williams & Wilkins; 2008; 479 p.