

ФОРМИРОВАНИЕ ЛАЗЕРНОГО МИКРОАБЛЯЦИОННОГО ТОННЕЛЯ ДЛЯ ИНИЦИИРОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ АЛЬВЕОЛЯРНОЙ КОСТИ. ПИЛОТНЫЕ *ex vivo* ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.716.86.001.6–089:57
Поступила 07.11.2013 г.



М.М. Карабут, младший научный сотрудник лаборатории изучения оптической структуры биоткани НИИ биомедицинских технологий¹; аспирант²;

А.В. Беликов, д.ф.-м.н., профессор кафедры лазерной техники и биомедицинской оптики³;

А.В. Скрипник, к.ф.-м.н., доцент кафедры лазерной техники и биомедицинской оптики³;

Т.В. Струнина, научный сотрудник кафедры лазерной техники и биомедицинской оптики³;

С.С. Кузнецов, д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии¹;

Е.Б. Киселева, младший научный сотрудник лаборатории изучения оптической структуры биоткани НИИ биомедицинских технологий¹;

Е.В. Губарькова, младший научный сотрудник лаборатории изучения оптической структуры биоткани НИИ биомедицинских технологий¹; аспирант²;

И.В. Сенина-Волжская, к.м.н., доцент кафедры стоматологии ФПКВ¹;

Ф.И. Фельдштейн, к.ф.-м.н., консультант⁴;

Г.Б. Альтшулер, д.ф.-м.н., научный консультант⁴;

Н.Д. Гладкова, д.м.н., профессор, зам. директора по науке НИИ биомедицинских технологий, зав. лабораторией изучения оптической структуры биотканей НИИ биомедицинских технологий¹

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603000, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

³Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, 197101, пр. Кронверкский, 49;

⁴Dental Photonics Inc., Walpole, MA 02081, USA, 1600 Boston-Providence Highway

В последние годы установлена способность эрбиевого лазера эффективно вызывать абляцию костных тканей с минимальным коллатеральным повреждением. Нехирургическое лечение периодонтита с использованием эрбиевого лазера приводит к уменьшению глубины карманов и улучшению клинического уровня прикрепления. Однако периодонтальная противовоспалительная терапия должна решать не только эту задачу, но также запускать регенерацию тканей (в том числе и костной), поврежденных во время болезни.

Цель исследования — оценка возможности формирования лазерного микроабляционного тоннеля в десне и альвеолярной кости с помощью импульсно-периодического одномодового Er:YAG-лазера, определение лазерных параметров, обеспечивающих размеры тоннеля и его коагуляционной стенки, необходимые для инициирования заживления и регенерации альвеолярной кости.

Материалы и методы. В качестве модели использовались челюсти свиньи *ex vivo*. Исследована технология чрездесневой микроперфорации альвеолярной кости челюсти, в которой применен лабораторный прототип лазера и системы доставки излучения Alta PE-AT.

Результаты. Под действием лазерных импульсов с энергиями 5, 10 и 30 мДж выполнена одноимпульсная перфорация покрывающей челюсть десневой ткани толщиной ~1 мм с созданием микрократера (тоннеля) в находящейся под ней костной ткани. Определены характеристики лазерного тоннеля в десне, кости и дентине как функции параметров лазерного излучения. При оптико-микроскопическом и гистологическом контроле признаков карбонизации и существенного коллатерального повреждения костной ткани не обнаружено.

Для контактов: Гладкова Наталья Дорофеевна, тел. моб. +7951-910-66-57; e-mail: natalia.gladkova@gmail.com

Заключение. Продемонстрирована возможность чрездесневого микро сверления альвеолярной кости челюсти с использованием лабораторного прототипа Alta PE-AT одномодового (TEM_{00}) эрбиевого лазера, что может служить первым шагом для дальнейшего изучения инициирования заживления и регенерации альвеолярной кости челюсти.

Ключевые слова: микроабляционный тоннель; регенерация альвеолярной кости; периодонтин; лазерное воздействие; микроперфорация; Er:YAG-лазер.

English

Laser Microablative Tunnel Formation to Initiate Alveolar Bone Regeneration. Pilot *ex vivo* Study

M.M. Karabut, Junior Researcher, Biotussie Optical Structure Research Laboratory, Scientific Research Institute of Biomedical Technologies¹; Postgraduate²;

A.V. Belikov, D.Phys.-Math.Sc., Professor, the Department of Laser Technology and Biomedical Optics³;

A.V. Skripnik, PhD, Associate Professor, the Department of Laser Technology and Biomedical Optics³;

T.V. Strunina, Researcher, the Department of Laser Technology and Biomedical Optics³;

S.S. Kuznetsov, D.Med.Sc., Professor, the Department of Pathological Anatomy¹;

E.B. Kiseleva, Junior Researcher, Biotussie Optical Structure Research Laboratory, Scientific Research Institute of Biomedical Technologies¹;

E.V. Gubarkova, Junior Researcher, Biotussie Optical Structure Research Laboratory, Scientific Research Institute of Biomedical Technologies¹; Postgraduate²;

I.V. Senina-Volzhskaya, PhD, Associate Professor, the Department of Dentistry, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹;

F.I. Feldchtein, PhD, Consultant⁴;

G.B. Altshuler, D.Phys.-Math.Sc., Scientific Consultant⁴;

N.D. Gladkova, D.Med.Sc., Professor, Deputy Director for Science, Scientific Research Institute of Biomedical Technologies, Head of Biotussie Optical Structure Research Laboratory, Scientific Research Institute of Biomedical Technologies¹

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603000;

²Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

³St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, Kronverkskiy pr., 49, Saint Petersburg, Russian Federation, 197101;

⁴Dental Photonics, Inc., Boston-Providence Highway, Walpole, USA, 1600

In recent years there has been demonstrated the ability of Erbium (Er) laser to cause effective ablation of bone tissue with minimum collateral damage. Non-surgical treatment of periodontitis using Er laser improves probing depth and clinical attachment level. However, periodontal anti-inflammatory therapy should not be limited to these parameters, but also should initiate tissue regeneration including bone tissue damaged by the disease.

The aim of the investigation was to evaluate feasibility and characterize the process of laser microablative tunnel formation in gingiva and alveolar bone using a pulse-periodic, single mode Er laser, and determine laser parameters providing appropriate size of the tunnel and coagulation zone needed to initiate healing and regeneration of the alveolar bone.

Materials and Methods. *Ex vivo* pig jaw was used as a model for the study. To create a through-gingiva microperforation of the alveolar bone, we used a laboratory prototype of Er laser and delivery system Alta PE-AT (Dental Photonics, Inc.).

Results. We performed a microperforation of a 1 mm thick gingiva and created a microcrater (tunnel) in the underlying bone using a single pulse with energy 5, 10 and 30 mJ. The laser tunnel characteristics in the gingiva, bone and dentine were characterized as a function of laser irradiation parameters. Optical microscopy and histology examination did not reveal carbonization or significant collateral damage of the bone tissue.

Conclusion. Using a laboratory prototype of Alta PE-AT Er laser we demonstrated feasibility of through gingiva laser microperforation of alveolar bone that can serve as the first step towards further study of healing and initiation of the alveolar bone regeneration.

Key words: microablative tunnel; alveolar bone regeneration; periodontitis; laser treatment; microperforation; Er laser.

В стоматологической практике большую популярность приобрело использование лазеров в качестве альтернативного или дополнительного инструмента для лечения периодонтальных заболеваний [1, 2]. Такие

преимущества лазера, как кровоостанавливающий и бактерицидный эффекты, обеспечивают улучшение результатов лечения [3, 4]. Важное значение для лечения имеют такие параметры лазера, как длина волны,

энергия и частота повторения импульсов, мощность, время облучения, а также параметры лазерного пучка: именно они определяют поглощение и взаимодействие света с тканью [5]. Наиболее привлекательным для использования в периодонтологии является эрбиевый лазер на основе различных кристаллов с длиной волны 3 мкм (как, например, Er:YAG, Er:YSSG, Er:YLF, Er:YAP) [6] из-за высокого поглощения твердыми и мягкими тканями и минимальных тепловых побочных эффектов [7]. В ряде работ продемонстрированы способность эрбиевого лазера эффективно удалять зубной камень и липополисахариды с поверхности корня зуба, а также его противомикробный эффект [3, 8, 9]. Кроме того, нехирургическое лечение периодонта с использованием эрбиевого лазера может привести к значительному клиническому улучшению, о чем свидетельствуют уменьшение глубины карманов и улучшение клинического уровня прикрепления [10, 11]. Эрбиевый лазер может также использоваться в сочетании с обычными хирургическими методами лечения [8, 12, 13]. Отметим, что данный вид лазера лучше всего подходит для обработки твердых тканей за счет высокого поглощения его излучения водой и гидроксипатитами. Кроме того, основные компоненты кости, такие как органический матрикс и неорганические соли кальция, также имеют очень высокую степень поглощения его излучения. Способность эрбиевого лазера эффективно вызывать абляцию твердых тканей и, в частности, костных тканей с минимальным коллатеральным повреждением подтверждена рядом исследований [14, 15].

Основной целью лечения периодонтита является купирование воспалительного процесса, что в свою очередь останавливает прогрессирование заболевания. Однако для наилучшего эффекта периодонтальная терапия должна также запускать регенерацию тканей, поврежденных во время болезни [16]. Таким образом, стимуляция регенерации периодонтальных тканей является важнейшей задачей терапии заболеваний слизистой оболочки полости рта.

Известно, что при периодонтите и гингивите страдают не только мягкие, но и твердые ткани полости рта. Так, периодонтит проявляется прогрессирующей деструкцией зубных ячеек альвеолярных отростков [17]. Традиционное нехирургическое лечение деструктивных заболеваний периодонта направлено в основном на ликвидацию воспаления и не ставит задачи восстановления кости или соединительной ткани, поврежденных в процессе болезни [16]. При потере костной ткани полезно также индуцировать регенерацию альвеолярной кости.

В настоящее время убыль костной ткани в основном лечится методом пересадки [18] или направленной регенерации тканей [19]. Существует ряд методов, которые способны стимулировать восстановление кости. К ним можно отнести автогенные и гетерогенные костные трансплантаты, факторы роста (в основном, костных морфогенетических белков), полимерные мембраны, использующие белок матрицы эмали, а также низкоинтенсивную лазерную терапию [20].

Мы планируем индуцировать регенерацию костной

ткани с помощью фракционной лазерной микроабляции аналогично тому, как это делается для мягких тканей — кожи и слизистых оболочек. В предыдущих работах нашей группы [21, 22] было впервые показано, что однократная лазерная микрокоагуляционная фракционная обработка индуцирует регенерацию слизистой оболочки полости рта, что позволяет рассматривать этот метод в качестве перспективного способа лечения заболеваний десны и периодонтита. Насколько нам известно, исследований регенерации костной ткани, индуцированной лазерными микроповреждениями, ранее не проводилось.

Альвеолярная кость является наиболее кровоснабжаемой костной тканью в человеческом организме и поэтому может служить наилучшим объектом для демонстрации нового механизма регенерации. Эффект регенерации кожи без образования рубцов наблюдается при формировании абляционных колонок с диаметром менее 0,3 мм и шириной коагуляционной зоны менее 0,1 мм [23]. Можно предположить, что в костной ткани параметры абляционной колонки для инициации регенерации ткани с нормальной морфологией должны находиться в этих же пределах. При этом важно, чтобы колонка могла быть сформирована через десну и не требовала лоскутной хирургии. Таким образом, необходимым условием для реализации предложенной концепции регенерации альвеолярной кости является формирование лазерной абляционной колонки (лазерного тоннеля, лазерного кратера), начинающейся на поверхности десны и проникающей в кость вплоть до поверхности корня зуба (цемента).

Цель исследования — оценка возможности формирования лазерного микроабляционного тоннеля в десне и альвеолярной кости с помощью импульсно-периодического одномодового Er:YAG-лазера, определение лазерных параметров, обеспечивающих размеры тоннеля и его коагуляционной стенки, необходимые для инициирования заживления и регенерации альвеолярной кости.

Материалы и методы. В качестве животной модели использовали челюсти свиньи *ex vivo*. Обработку тканей челюсти лазерным излучением проводили в течение первых 12 ч с момента забоя животного.

Работа выполнялась в три независимых этапа. Цель I этапа состояла в изучении топографии и структуры альвеолярной области нижней челюсти свиньи с щечной стороны, включающей десневой край, альвеолярную кость, периодонтальную связку, цемент и дентин зуба, для выбора оптимального места лазерного воздействия. Целью II этапа был подбор подходящего режима лазерного облучения (оптимальной комбинации энергии и количества лазерных импульсов) для создания микроабляционного столбца в челюсти свиньи, проходящего через всю толщину слизистой оболочки и часть альвеолярной кости с минимальным повреждением окружающих тканей. Целью III этапа являлось изучение состояния кости альвеолярного отростка и тканей зуба после лазерного воздействия, что подтверждалось морфологическими исследованиями. Для каждого этапа эксперимента подготавливались новые, интактные

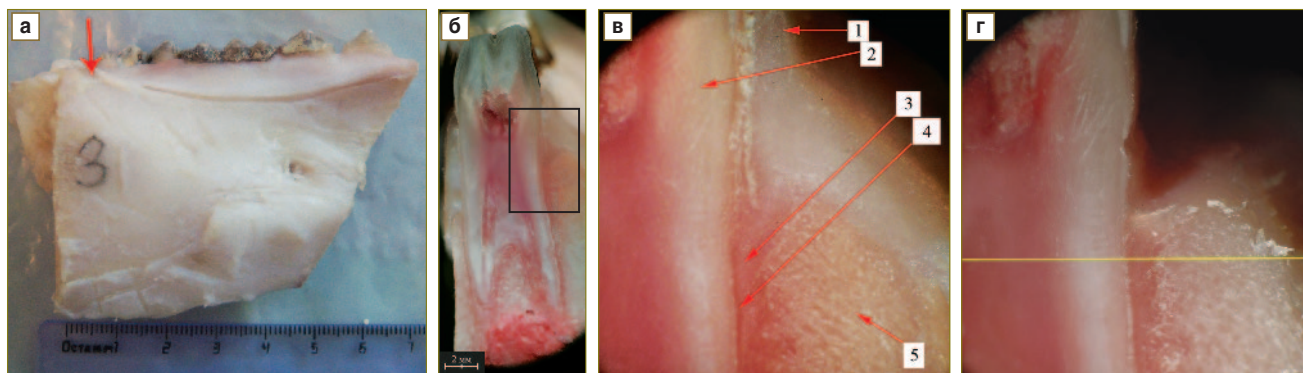


Рис. 1. Фрагмент нижней челюсти свиньи: *а* — стрелкой указан уровень продольного распила; *б* — продольный распил на уровне премоляра (выделенная область увеличена на рисунках *в* и *г*); *в* — область, включающая десну (1), дентин (2), периодонтальную связку (3) и цемент (4), альвеолярную кость (5); *г* — та же область после удаления десны. Желтая линия — уровень, на котором в дальнейшем проводилось лазерное облучение и на котором сделан гистологический срез, представленный на рис. 8

Основные технические характеристики лабораторного прототипа одномодового (TEM₀₀) эрбиевого лазера Alta PE-AT

Тип активной среды	Er:YAG
Длина волны излучения, мкм	2,94
Режим работы лазера	Свободная генерация, импульсно-периодический, одномодовый, TEM ₀₀
Частота следования импульсов излучения, Гц	1
Длительность импульса излучения, мкс:	
по основанию	125 (±10%)
по полувысоте	105 (±10%)
Режим лазерного воздействия на объект/мишень	Неконтактный, через линзу
Фокусное расстояние линзы, мм	~38
Размер лазерного пучка в фокусе линзы, мкм	~200
Энергия излучения в месте обработки, мДж	До 30

образцы нижней челюсти свиньи, включающие молярную часть, которая содержала 7 коренных зубов (2 премоляра и 5 моляров) (рис. 1, *а*).

На I этапе эксперимента проводили продольный распил фрагмента челюсти на уровне премоляра, который позволил установить топографию и структуру альвеолярной области нижней челюсти свиньи, включающей десневой край, альвеолярную кость, периодонтальную связку, цемент и дентин зуба (рис. 1, *б–г*). Это исследование показало, что для достижения костной ткани микроабляционное лазерное воздействие должно проводиться как минимум на расстоянии 4–5 мм от десневого края.

Характеристики первого лабораторного прототипа лазера и системы доставки излучения Alta PE-AT (Dental Photonics, Inc., США), использованного в работе, представлены в таблице. Внешнее водяное орошение поверхности десны в процессе лазерной обработки не применялось.

Лазерное излучение лабораторного прототипа Alta PE-AT фокусировалось на поверхность десны свиньи на уровне 8 мм апикально от десневого края с щечной стороны (рис. 2).

На II этапе эксперимента энергия лазерного импуль-

са (E_p) и количество лазерных импульсов (N_p), воздействующих на одну и ту же точку на поверхности десны, варьировались. Энергия лазерного импульса составляла 5, 10 и 30 мДж. Количество лазерных импульсов для каждой из энергий — 5, 7, 10 и 50. Внешний вид обработанной лазерным излучением десны фотографировали с помощью оптического микроскопа ($\times 4$). После фотографирования десну механически отделяли от твердой ткани и без фиксации формалином окрашивали нитросиним тетразолием для проведения морфологического исследования, при котором оценивали размеры образованных в десне микроколонок и степень коллатерального повреждения (макроскопически, визуально, без приготовления гистологических слайдов). Твердую ткань (альвеолярную кость, периодонтальную связку, цемент и дентин зуба) механически сошлифовывали до середины микрократера для исследования его размеров.

Всего на II этапе эксперимента для каждой комбинации энергии и количества лазерных импульсов (12 комбинаций) было сформировано по 4 микроабляционных столбца, таким образом, общее количество микроабляционных столбцов, исследованных на данном этапе, составило 48.

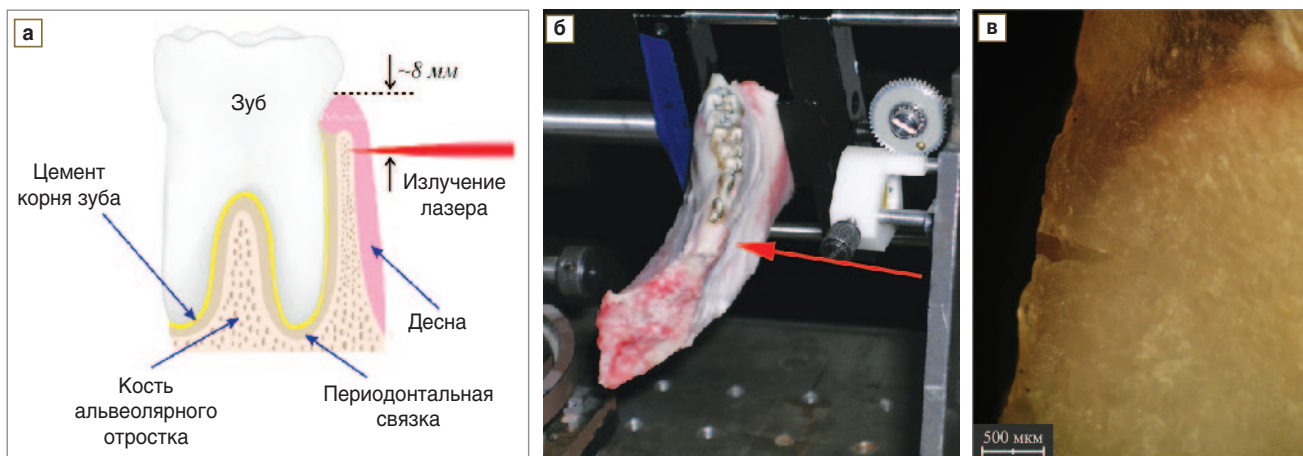


Рис. 2. Схема (а), фотография эксперимента (б) и фотография образца после лазерного воздействия (в). Стрелкой на рисунке б указано направление лазерного воздействия

На III этапе эксперимента лазерное воздействие на объект исследования (см. рис. 1, а) осуществляли по той же схеме (см. рис. 2). Собственно лазерное воздействие выполняли при одностороннем применении серии из 7 импульсов с энергией излучения 5 мДж. Было нанесено три колонки под тремя зубами. Кроме того, для удобства дальнейшего распознавания был нанесен лазерный маркер с энергией 30 мДж и количеством импульсов 7, который находился на 4 мм коронально от собственно лазерного воздействия (5 мДж), т.е. на расстоянии 4 мм от десневого края.

Для приготовления гистологических препаратов из целого фрагмента кости челюсти (включая десну) выпиливали кусочки размером $1,5 \times 1,5$ см на глубину до 3 мм (до зуба). Лазерный микрократер и маркер находились в центре выпиленного фрагмента. Кусочки помещали на 24 ч в 10% раствор формальдегида для фиксации, затем в декальцинирующую жидкость, содержащую азотную кислоту, в которой кость подвергалась декальцинации в течение 6 сут. После серии промывок и фиксации материал заливали в парафин при температуре 62°C и выдерживали в течение 48 ч. Блоки монтировали таким образом, чтобы в дальнейшем получить поперечные гистологические срезы альвеолярной лунки, включающей зуб, которые проходили вдоль лазерной колонки. Гистологические препараты кости окрашивали гематоксилином и эозином с последующим наблюдением их в световом микроскопе Leica DMLS (Германия) при увеличении 50, 100, 200, 400 и цифровым фотографированием с использованием камеры Nikon COOL PIX5000 (Япония). Важно отметить, что главной задачей морфологического этапа данного исследования была оценка изменения костной ткани под воздействием лазерного излучения. При этом сохранение слизистой оболочки на препарате не было решающим.

Результаты. Как уже отмечалось выше, I этап исследования позволил точно определить топографию исследуемой области нижней челюсти свиньи, которая показала, что для достижения альвеолярной кости лазерная микроабляционная колонка должна

наноситься как минимум на расстоянии 4–5 мм от десневого края.

На II этапе исследования установлено, что лазерное воздействие приводит к сквозной перфорации десневой ткани и формированию кратера в костной ткани (рис. 3 и 4). В ряде случаев на поверхности мягкой ткани десны наблюдалась карбонизация, которая была характерна для большого количества лазерных импульсов ($N_p=50$) и связана с обезвоживанием ткани в процессе многократного воздействия лазерного излучения (см. рис. 3). Следует отметить, что карбонизация поверхности десны отсутствовала для всех используемых в работе энергий лазерного импульса, если количество импульсов не превышало 10.

Сформированный в результате лазерного воздействия микроабляционный столбец состоял из сквозного отверстия (микроколоники) в десне (рис. 5) и микрократера в расположенной под десной костной ткани (рис. 6) на расстоянии 8 мм от десневого края. При любой комбинации энергии и количества лазерных импульсов десневая ткань (толщина десны в зоне воздействия около 1 мм) перфорировалась насквозь, т.е. однодочное лазерное излучение даже с энергией 5 мДж и количеством импульсов, равным 5, способно насквозь перфорировать мягкую десневую ткань толщиной 1 мм и достигать костной ткани челюсти свиньи. Отметим, что микроколоники в части, обращенной к костной ткани, расширяются, т.е. увеличиваются в диаметре, что может быть связано как с отражением лазерной или индуцированной лазером акустической энергии от границы «мягкая–твердая ткань» (отраженное лазерное или акустическое излучение дополнительно разрушает мягкую ткань в этой области), так и с абляционным воздействием на мягкую ткань продуктов лазерного разрушения костной ткани. Следует обратить внимание на крайне незначительную зону коллатерального повреждения окружающих микроколонику мягких тканей, которая определяется как потеря окраски нитросиним тетразолием и означает потерю жизнеспособности ткани. Величина коллатерального повреждения, определяемая макроскопически при увеличении микроскопа $\times 4$, зависит от

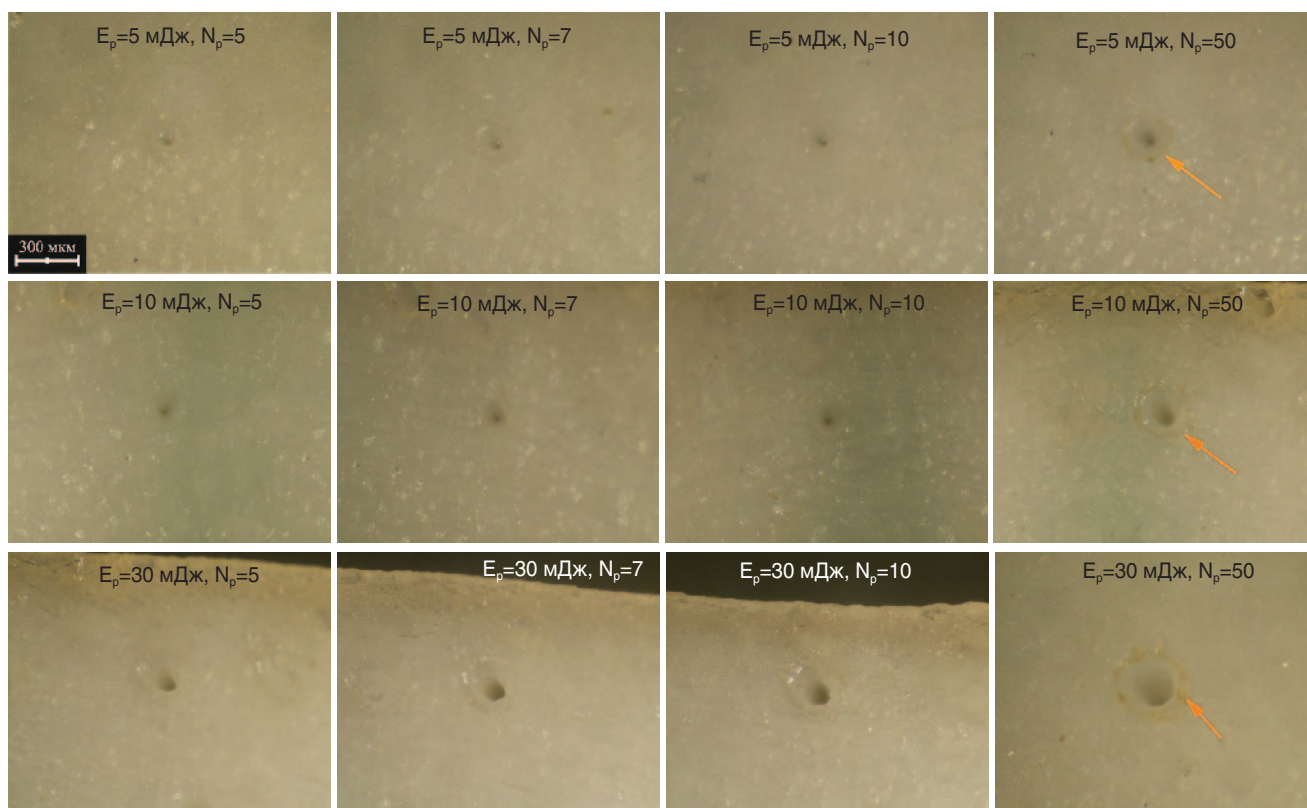


Рис. 3. Внешний вид мест проведения лазерного воздействия на фронтальной поверхности десневой ткани; $\times 4$. Стрелками обозначены признаки незначительной карбонизации

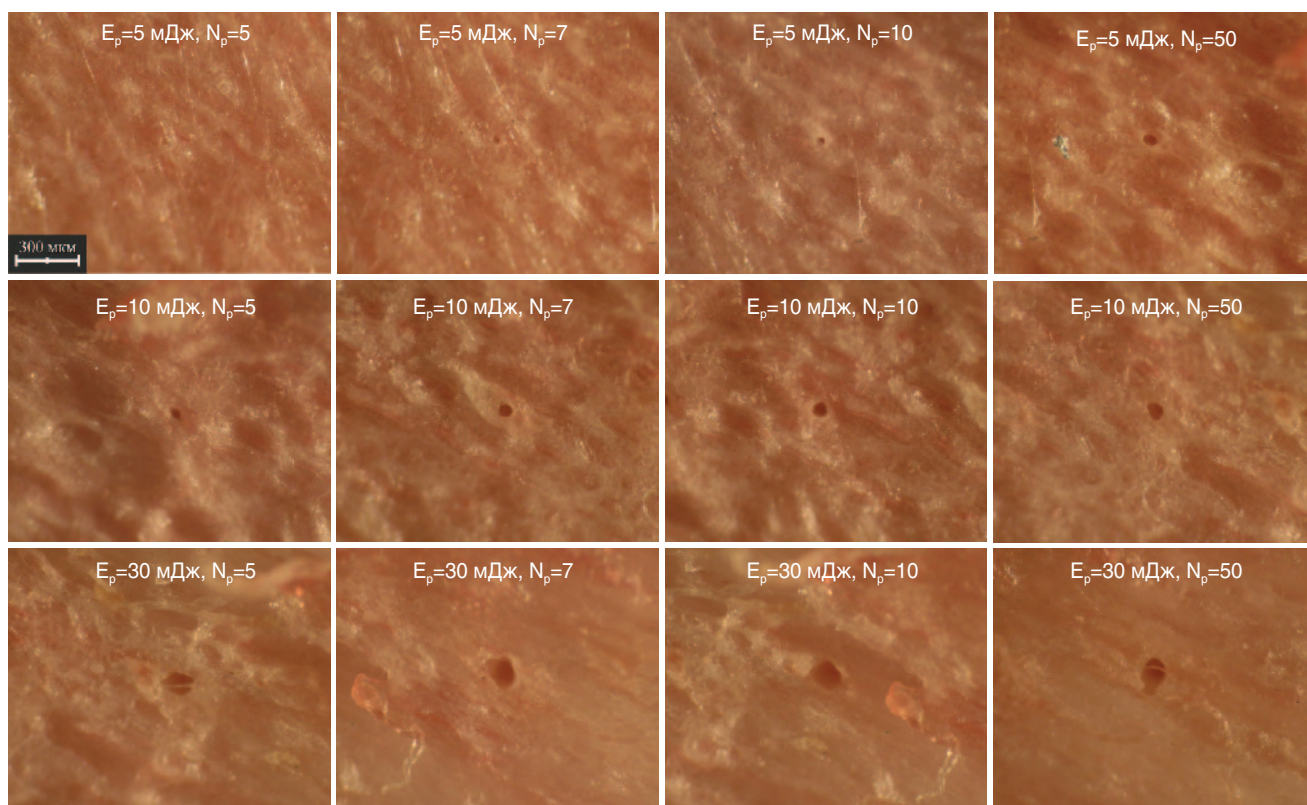


Рис. 4. Внешний вид мест проведения лазерного воздействия на поверхности костной ткани, находящихся непосредственно под местом облучения десневой ткани; $\times 4$

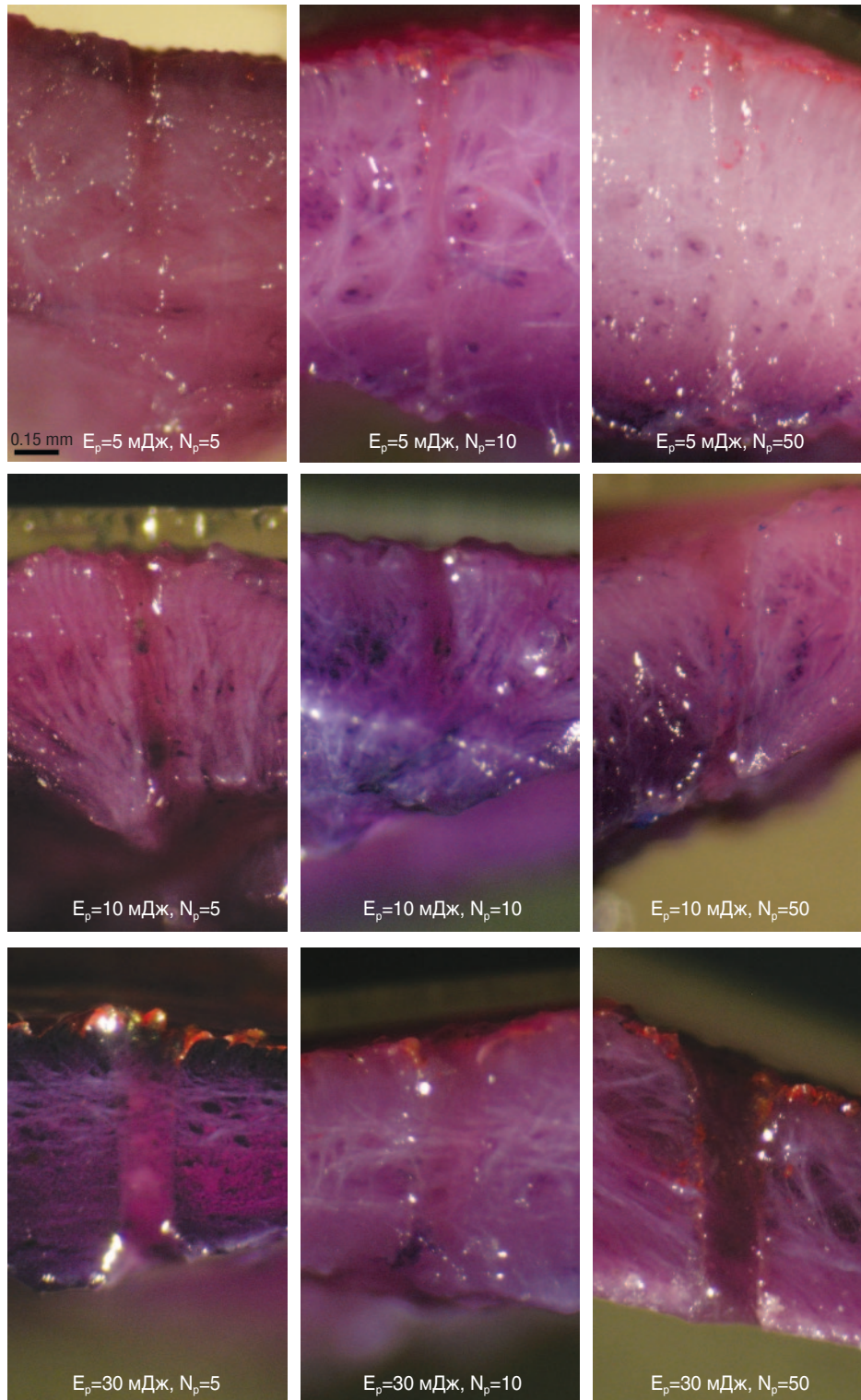


Рис. 5. Фотографии вертикальных разрезов микроколонок (окраска нитросиним тетразолием, тотальный препарат с продольным разрезом), сформированных в десне челюсти свиньи под воздействием излучения устройства Alta PE-AT. Размер бара — 150 мкм, $\times 4$

энергии (E_p) и количества лазерных импульсов (N_p). Для $E_p=5$ мДж и $N_p=5$ толщина коллатерального повреждения у стенки микроколоники составляет 10–20 мкм, а при $E_p=30$ мДж и $N_p=50$ — достигает 40–50 мкм.

На рис. 6 представлены распилы альвеолярной кости после лазерного воздействия в различных режимах. Толщина альвеолярной кости в месте лазерного кратера составляет порядка 1 мм. Отметим, что

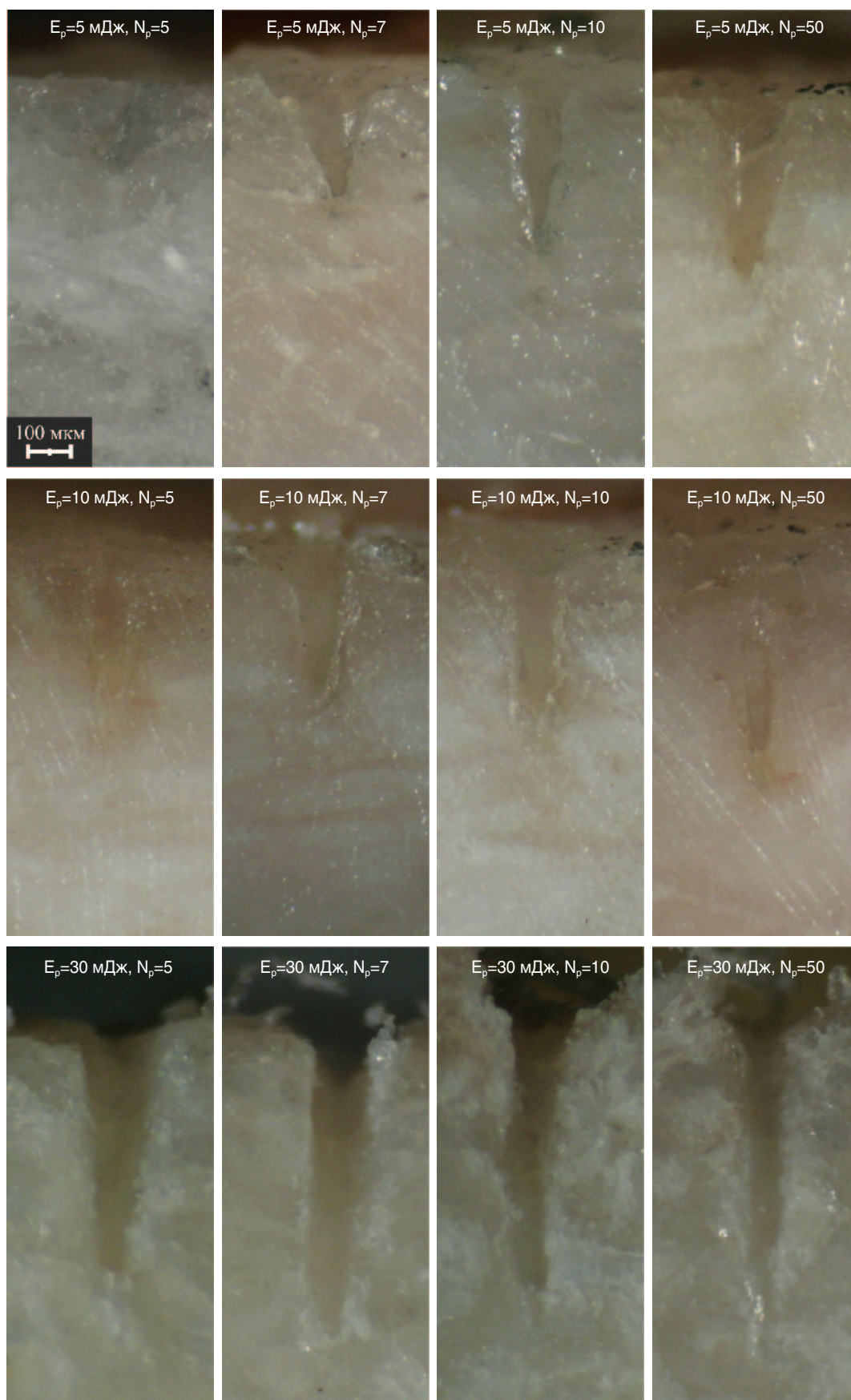


Рис. 6. Фотографии вертикальных распилов микрократеров альвеолярной кости в месте проведения лазерного воздействия; $\times 4$

в ряде случаев на стенках микрократера в альвеолярной кости также наблюдалась карбонизация, которая была характерна для большого количества лазерных импульсов ($N_p=50$). Как уже говорилось, карбонизация может быть связана с обезвоживанием ткани в процессе многократного воздействия лазерного излучения. Скорее всего, эта проблема исчезнет при использовании внешнего водяного орошения поверхности десны в процессе ее лазерной обработки. Нужно отметить, что карбонизация отсутствует для всех используемых в работе энергий лазерного импульса, если количество импульсов не превышает $N_p=10$. Установлено, что для создания микрократера в альвеолярной кости достаточно воздействовать на десну с $E_p=5$ мДж и $N_p=5-7$.

Были измерены значения внешнего диаметра лазерного кратера для различных лазерных режимов при совместном его формировании в десневой и костной тканях. Выявлено, что диаметры увеличиваются с ростом E_p и N_p . В эксперименте диаметр микроколонок в десне находился в диапазоне 60–450 мкм, диаметр микрократеров в костной ткани — в диапазоне 50–250 мкм.

При оценке зависимости глубины микрократера в твердой ткани челюсти свиньи от энергии лазерного импульса E_p при различных N_p отмечено, что глубина кратера увеличивается с ростом E_p и N_p . В эксперименте глубина микрократера в твердой ткани челюсти свиньи изменялась в диапазоне 200–1000 мкм.

Таким образом, на II этапе работы были определены режимы (энергия и количество импульсов) для формирования микроабляционного столбца в челюсти свиньи. Выявлено, что для перфорации мягкой ткани и создания микрократера в альвеолярной кости достаточно воздействовать на десну с энергией 5 мДж и количеством импульсов, равным 5–7.

На III этапе работы использовался именно этот минимальный по энергии режим лазерного облучения, поскольку даже он мог обеспечить сквозную перфорацию десневой ткани с последующей деструкцией расположенной под ней кости челюсти.

Цифровые фотографии лазерной микроперфорации челюсти, полученные при использовании режима 7 импульсов с энергией 5 и 30 мДж, представлены на рис. 7. Диаметр микроперфорации в альвеолярной кости при воздействии 7 импульсов с энергией 5 мДж сопоставим (порой даже меньше) с углублением в кости от отростков надкостницы после удаления десны (рис. 7, а). Это значительно затрудняет идентификацию на гистологическом срезе микроколонок столь малого диаметра. По этой причине в зону морфологического исследования на расстоянии 4 мм от десневого края был введен маркер, полученный при режиме лазерного излучения 30 мДж и 7 импульсов.

При морфологическом макроскопическом исследовании экспериментального материала на слизистой оболочке обнаруживались видимые невооруженным глазом изменения в виде небольших кратеров, соответствующие лазерным маркерам. Микроабляционные колонки невооруженным глазом не были видны. При использовании лупы с 7-кратным увеличением на слизистой оболочке были видны точечные дефекты округлой формы диаметром 150–200 мкм. В окружающих их участках слизистой оболочки при низком увеличении изменений не выявлено. При рассечении слизистой оболочки и подлежащих мягких тканей (фиброзная ткань десны) изменения отсутствовали. После снятия десны на поверхности кости при использовании лупы с 7-кратным увеличением обнаруживались только микрократеры диаметром 300–400 мкм, соответствующие лазерным маркерам. Окружающая костная ткань была без видимых изменений.

Как известно, костная ткань состоит из минерального и органического компонентов. Органическая часть кости составляет 30% ее массы, минеральная — 60%, на воду приходится 10%. Минеральный компонент обеспечивает прочность и состоит преимущественно из кальция, фосфора и микроэлементов. Главный органический компонент — остеоин (являющийся коллагеном I типа), который делает кость более эластичной. Кость представляет собой совокупность карбонизированных

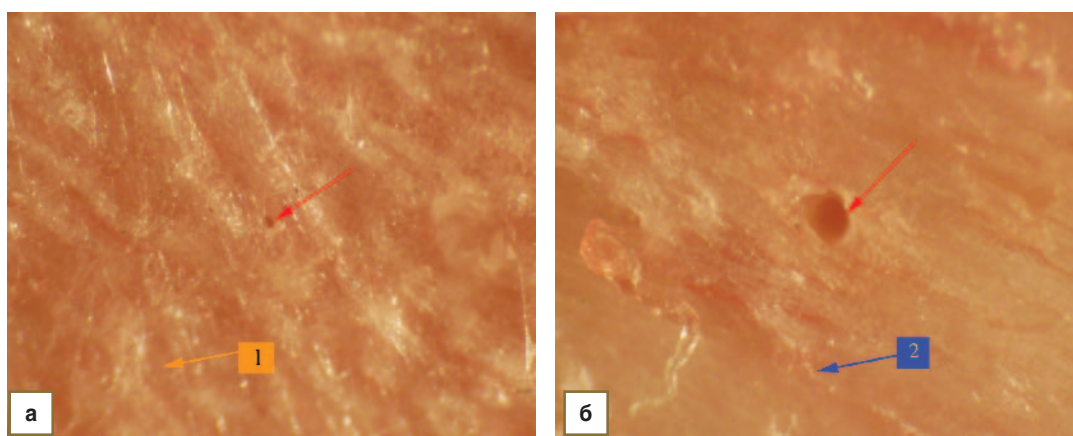


Рис. 7. Укрупненный вид участка костной ткани с проведенной на нем лазерной микроперфорацией в режиме 7 импульсов с энергией 5 мДж (а) и 7 импульсов с энергией 30 мДж (б). Десневая ткань с поверхности костной ткани удалена. Область микроперфорации указана стрелкой. 1 — поверхностные неровности, места проникновения в кость отростков надкостницы; 2 — остатки волокон надкостницы

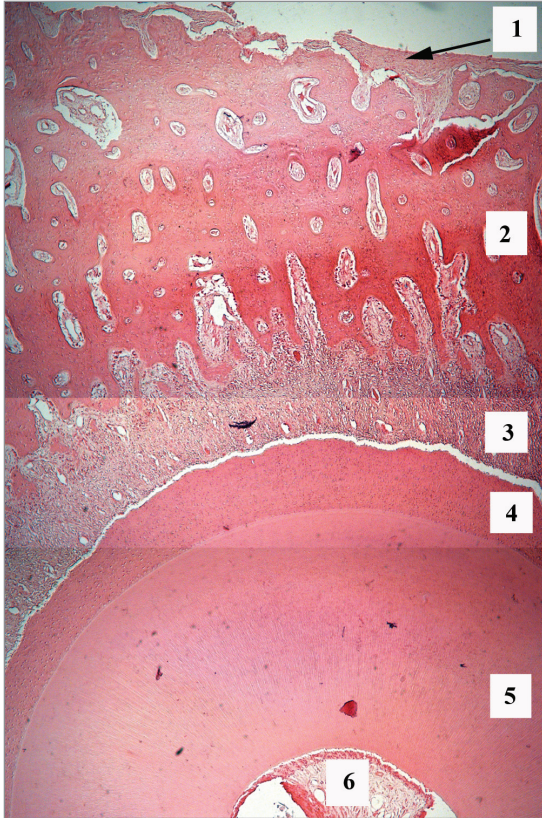


Рис. 8. Поперечный срез интактной нижней челюсти свиньи на расстоянии 8 мм от десневого края после механического удаления слизистой оболочки: 1 — надкостница, 0,11–0,22 мм; 2 — губчатая кость, 1,22–3,50 мм; 3 — периодонтальная связка, 0,42–0,69 мм (с выростами); 4 — цемент, 0,30–0,34 мм; 5 — дентин, 1,0–1,2 мм; 6 — пульпа зуба, 1,0–1,5 мм. Размер кадра — 2,53×3,81 мм; окраска — гематоксилин-эозин

кристаллов апатита нанометрового размера в органическом матриксе из коллагеновых волокон с высокой иерархической структурой. Первичная последовательность аминокислот в молекуле коллагена идентична в костях и других соединительных тканях, однако коллаген кости имеет особый профиль сшивок, которые и определяют специфику структуры и физических свойств этого белка в кости.

Поперечный срез интактной кости нижней челюсти свиньи на расстоянии 8 мм от десневого края (рис. 8) — именно на этом уровне наносились лазерные микроабляционные колонки — включает переднюю стенку зубной альвеолы (надкостница, компактная и губчатая кости), периодонтальную связку, цемент, дентин и пульпу зуба. На рисунке указаны диапазоны толщины структур, обнаруженные нами при оценке 60 исследованных гистологических слайдов.

Стенка зубной альвеолы представлена специальным типом костной ткани — альвеолярной костью, особенностью которой является тонкая надкостница, состоящая из двух слоев (наружного фиброзного и внутреннего камбиального), и очень тонкая компактная пластинка (рис. 9, а). Основную часть составляет губчатый (трабекулярный, альвеолярный) слой. Толщина стенки интактной зубной альвеолы в нашем исследовании варьирует в значительных пределах в зависимости от удаленности от десневого края — от 1 до 3 мм. Губчатый слой альвеолярной кости включает трабекулы и межтрабекулярные пространства. Основу костных трабекул составляет остеоид — вещество кости, состоящее из коллагеновых волокон и содержащее остеоциты. При гистологической окраске остеоид проявляет свойства эозинофилии, однако местами можно видеть «полосы» базофилии с нечеткими границами

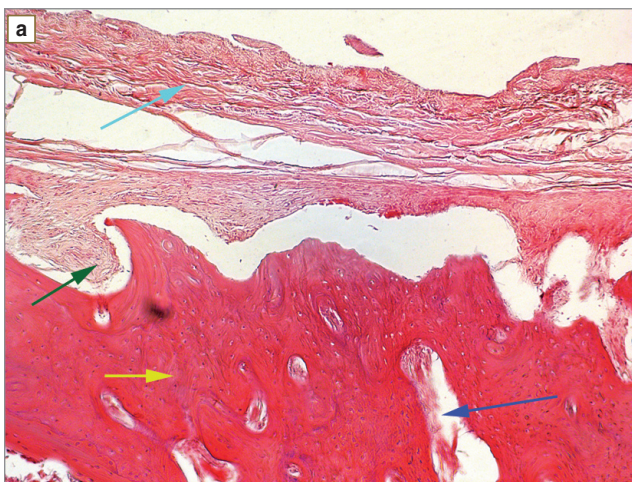
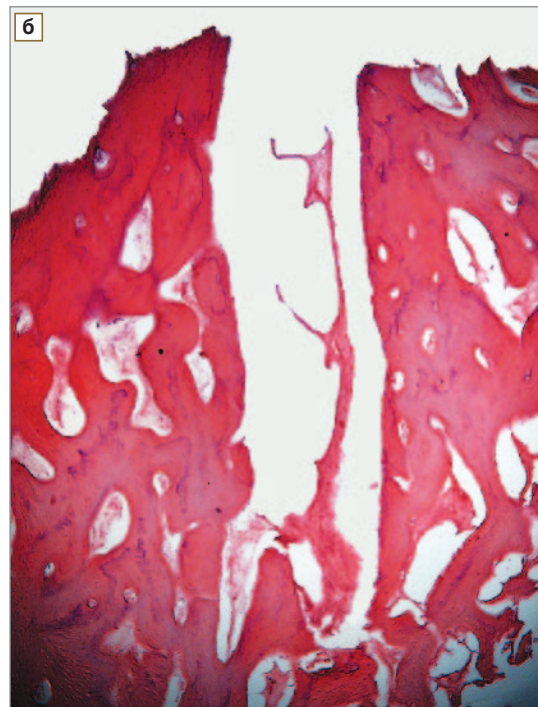


Рис. 9. а — надкостница губчатой кости нижней челюсти свиньи (светло-голубая стрелка) и углубления от ее отростков на кости (темно-зеленая стрелка); ×20, размер кадра — 650×490 мкм; трабекулы (желтая стрелка) и межтрабекулярные пространства (синяя стрелка); б — лазерный микроабляционный столбец в альвеолярной кости нижней челюсти свиньи, образованный в режиме лазерного воздействия 7 импульсов с энергией 30 мДж; ×5, размер кадра — 1960×2600 мкм



(«линии склеивания») на слабом базофильном фоне межклеточного вещества.

Трабекулы губчатого вещества располагаются упорядоченно, по функциональным линиям сжатия и расширения. Толщина трабекул колеблется в больших пределах — 100–250 мкм. Межтрабекулярные пространства заполнены грубоволокнистой соединительной тканью, плотно прилегающей к поверхности кости и отделенной от нее слоем остеобластов, вместе составляющих эндост (см. рис. 9, а). Размер межтрабекулярных пространств также варьирует в очень больших пределах (20–200 мкм), на гистологических препаратах они расположены беспорядочно. Со стороны зуба кость связана с круговой периодонтальной связкой, поддерживающей зуб за счет проникающих в кость тяжей соединительнотканых волокон (см. рис. 8).

На рис. 9, б продемонстрирована лазерная колонка, полученная в ходе эксперимента при использовании режима лазерного воздействия 7 импульсов с энергией 30 мДж (лазерного маркера). Зона лазерного воздействия на гистологическом препарате альвеолярной кости выглядит как вытянутый дефект (микроратер, тоннель, столбец) диаметром 430 мкм и глубиной 2,1 мм. Внутри микроратера отсутствуют какие-либо структуры, за исключением сильно деформированных и резко истонченных разобщенных трабекул, имеющих вид сжатых, «тающих» структур. Клеточных элементов (osteoblastов и osteoclastов) не обнаружено. В коллатеральной зоне вокруг колонки не наблюдается признаков коагуляции коллагеновых волокон остеоида, изменений osteocytов не обнаружено.

Обсуждение. Как известно, регенерация кости происходит путем пролиферации клеток камбиального слоя надкостницы, эндоста, малодифференцированных клеток стромы костного мозга и мезенхимальных клеток, составляющих адвентицию растущих сосудов. Репаративную регенерацию принято делить на следующие 4 стадии [24].

1-я стадия — дифференцировка и пролиферация клеточных элементов;

2-я стадия — образование и дифференцировка тканевых структур;

3-я стадия — образование ангиогенной костной структуры;

4-я стадия — перестройка первичного регенерата и реституция кости.

Репаративная регенерация кости нижней челюсти хорошо изучена. Она занимает в среднем 3–4 нед и обычно описывается с еженедельной оценкой морфологических данных [25]. Через 1 нед после повреждения дефект частично заполняется элементами крови (преимущественно гранулоцитами и эритроцитами), фрагментами рыхлой соединительной ткани, в которой можно обнаружить отдельные островки молодой кости. Через 2 нед дефект уже полностью закрывается молодой костной тканью с большим числом полнокровных кровеносных сосудов по краям дефекта. На 3-й неделе дефект полностью замещается вновь образованной костной тканью. Через 4 нед место заживления удается найти только по следам костной

мозоли. К этому моменту структура кости полностью сформирована.

В исследованиях многих групп изучалось заживление и регенерация кости после лазерного воздействия. Известно, что независимо от вида лазера заживление кости после остеотомии, костной пластики или имплантации является сложным процессом, включающим местный и системный ответ организма, а также участие различных типов клеток, ферментов, факторов роста, цитокинов и других типов сигнальных белков. Два исследования [26, 27] сравнивали заживление дефектов большеберцовой кости после остеотомии у крыс, созданных ротационным буром, CO₂-лазером (780 и 1032 Дж/см²) и Nd:YAG-лазером (714 и 1000 Дж/см²). В течение всего срока наблюдения (от 0 до 63 сут после обработки) независимо от плотности энергии и использования воздуха/воды для охлаждения поверхности во время облучения заживление кости было очень сильно замедлено. Серьезные коллатеральные повреждения стали основным фактором, который повлиял на заживление лазериндуцированного разреза кости. Установлено, что при замедленном заживлении всегда обнаруживается наличие остаточного карбонизированного слоя на обработанной поверхности, неких инертных костных фрагментов, инкапсулированных фиброзной соединительной тканью, омертвевших частей кости и фрагментов костей в окружении многоядерных гигантских клеток [8, 9]. В работе [28] для создания отверстий в кости диаметром 0,4 мм на верхней и нижней челюсти кроликов был использован Er, Cr:YSGG-лазер с плотностью энергии 80 Дж/см². Полное заживление ран было выявлено на 56-й день после обработки.

Последовательность событий раннего этапа заживления (1-я неделя), в котором происходят воспаление и ревазуляризация, особенно важна. Воспалительная стадия восстановления характеризуется миграцией нейтрофилов с последующей миграцией макрофагов к дефекту. Макрофаги играют важную роль в иницировании восстановления тканей, продуцируя факторы роста, которые стимулируют ангиогенез, пролиферацию фибробластов и созревание [14].

В исследовании [14] проведен сравнительный анализ процесса заживления дефекта костей свода черепа у крыс после обработки Er:YAG-лазером, CO₂-лазером и после механической обработки. В зоне дефекта, созданного Er:YAG-лазером, отмечалась более выраженная воспалительная клеточная инфильтрация, пролиферация фибробластов и ревазуляризация по сравнению с тканями, обработанными механическим буром и CO₂-лазером. Так, через 10 мин после обработки Er:YAG-лазером в зоне лазерного повреждения наблюдалась активная миграция гранулоцитов и эритроцитов, которые формировали агрегаты различной плотности. На следующий день после воздействия количество эритроцитов уменьшалось, а число полиморфно-ядерных лейкоцитов и макрофагов возрастало, особенно по краям дефекта. К 3-му дню количество нейтрофилов и фибробластов продолжало расти. Кроме того, отмечались фагоцитоз и ангиогенез. В созревающем сгустке крови, который покрывал поверхность, были найдены

макрофаги. Гистологический анализ на 7-й день выявил преобладание грануляционной ткани с фибробластами и остеобластами в дефекте, обработанном Er:YAG-лазером. Участки минерализации обнаружены рядом с лазерным дефектом, а в некоторых образцах — в его центре. Можно видеть фибриллы коллагена, окружающие остеобласты. Анализ на 14-й день показал значительно большее образование новой костной ткани при обработке Er:YAG-лазером по сравнению с механическим бурением и CO₂-лазером. Наблюдались группы остеобластов, покрывающие остеоид, и новая костная ткань, а также остециты, встроенные в новую кость. Таким образом, начальное заживление кости после воздействия Er:YAG-лазером происходит быстрее, чем после обработки механическим бурением и CO₂-лазером. Это может быть связано с тем, что при обработке Er:YAG-лазером поверхность кратера получает минимальные механическое (по сравнению с бором) и термическое (по сравнению с CO₂-лазером) повреждения, в результате чего создается подходящая поверхность для прикрепления клеток, поэтому такая лазерная обработка может быть более эффективной с точки зрения заживления ран костной ткани [14].

Известно, что восстановление костного повреждения зависит прежде всего от наличия клеток-предшественников остеобластов в окружающей костной ткани и способности этих клеток вторгаться в повреждение и дифференцироваться в остеобласты. В исследовании [28] показано положительное влияние лазерного излучения с длиной волны 780 нм на стимуляцию регенерации костного дефекта на бедренной кости у крыс. Значительное количество вновь образованной костной ткани в пределах 15 дней указывает на биомодулирующий эффект лазерной терапии на ранних стадиях процесса восстановления, в котором наблюдается большое количество клеток, в основном остеобластов и недифференцированных клеток. Авторы предполагают наличие биостимулирующего эффекта лазерного излучения при воздействии именно на эти клетки [29].

Механизмы стимулирования восстановления кости с помощью лазерного излучения еще не до конца изучены, но они представлены сложными процессами, включающими увеличение васкуляризации, производство коллагена, распространение и дифференцировку остеогенных клеток, а также увеличение синтеза ДНК и РНК, т.е. воздействие на рост клеток и синтез белка, митохондриальное дыхание и синтез АТФ [29]. В дальнейших исследованиях будет представлен новый подход к вопросу стимулирования регенерации костной ткани путем создания решетки лазерных микротоннелей с диаметром менее 0,3–0,4 мм, окруженных интактной тканью. Процесс заживления такого микроповреждения должен развиваться достаточно быстро с образованием нормальной костной ткани. Таким образом, при описанной фракционной лазерной обработке альвеолярной кости, поврежденной при периодонтите, можно ожидать образования нормальной костной ткани, т.е. ее регенерации.

Заключение. Представленная процедура формирования лазерного микроабляционного тоннеля с ис-

пользованием лабораторного прототипа одномодового (TEM₀₀) эрбиевого лазера Alta PE-AT является первым шагом для дальнейшего изучения возможностей иницирования заживления и регенерации альвеолярной кости челюсти. Примененная технология чрездесневого микросверления альвеолярной кости нижней челюсти свиньи, в которой использован импульсно-перIODический одномодовый Er:YAG-лазер на длине волны 2,94 мкм, показала, что подобная процедура принципиально возможна. Под действием лазерных импульсов с энергиями 5, 10 и 30 мДж возможна сквозная перфорация покрывающей челюсть десневой ткани толщиной ~1 мм с созданием микрократера в находящейся под ней альвеолярной кости. При макро- и микроскопическом контроле явных признаков карбонизации костной ткани не обнаружено.

Показано, что для создания перфорации мягкой ткани и создания микрократера в альвеолярной кости на расстоянии 8 мм от десневого края достаточно воздействовать на десну с минимальной энергией 5 мДж и количеством импульсов, равным 5–7. Продемонстрировано образование микрократеров в альвеолярной кости с диаметром 50–250 мкм и глубиной до 1 мм.

Зона лазерного повреждения, созданная на расстоянии 4 мм от десневого края при режиме 30 мДж и 7 импульсах, на гистологических препаратах альвеолярной кости выглядит как вытянутый дефект (микрократер) диаметром 400 мкм и глубиной 2,1 мм. Коагуляционная зона коллатерального повреждения в костной ткани не превышает 10 мкм.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке гранта Фонда Сколково №МГ-13-21 от 6 февраля 2013 г. «Разработка и коммерциализация модульной лазерной системы для лечения заболеваний пародонта».

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность д.х.н. Наталье Юрьевне Игнатъевой и профессору Эмилю Наумовичу Соболю за помощь и продуктивное обсуждение результатов экспериментов.

Литература

1. Ishikawa I., Sculean A. Laser dentistry in periodontics. In: 1st International workshop of evidence based dentistry on lasers in dentistry. Gutknecht N., editor. Quintessence Publishing 2007; 115–129.
2. Kreisler M., Al Haj H., d'Hoedt B. Clinical efficacy of semiconductor laser application as an adjunct to conventional scaling and root planing. *Lasers Surg Med* 2005 Dec; 37(5): 350–355.
3. Coletan S. Lasers in surgical periodontics and oral medicine. *Dent Clin North Am* 2004 Oct; 48(4): 937–962, vii.
4. Schwarz F., Aoki A., Becker J., Sculean A. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2008 Sep; 35(8 Suppl): 29–44.
5. Manni J.G. Dental applications of advanced lasers (DAAL). JGM Associates, Inc.; 2007.
6. Belikov A.V., Erofeev A.V., Shumilin V.V., Tkachuk A.M. Comparative study of the 3µm laser action on different hard tooth tissue samples using free running pulsed Er-doped YAG, YSGG, YAP and YLF lasers. *Dental Applications of Lasers 1993; SPIE 2080: 60–77.*
7. Aoki A., Mizutani K., Takasaki A.A., Sasaki K.M., Nagai S., Schwarz F., et al. Current status of clinical laser applications in

- periodontal therapy. *Gen Dent* 2008 Nov–Dec; 56(7): 674–687; quiz 688–689, 767.
8. Cobb C.M., Low S.B., Coluzzi D.J. Lasers and the treatment of chronic periodontitis. *Dent Clin North Am* 2010 Jan; 54(1): 35–53.
9. Cobb C.M. Lasers in periodontics: a review of the literature. *J Periodontol* 2006 Apr; 77(4): 545–564.
10. Sculean A., Chiantella G.C., Arweiler N.B., Becker J., Schwarz F., Stavropoulos A. Five-year clinical and histologic results following treatment of human intrabony defects with an enamel matrix derivative combined with a natural bone mineral. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008 Apr; 28(2): 153–61.
11. Gaspiric B., Skaleric U. Clinical evaluation of periodontal surgical treatment with an Er:YAG laser: 5-year results. *Journal of Periodontology* 2007 Oct; 78(10): 1864–1871.
12. Crespi R., Cappare P., Toscanelli I., Gherlone E., Romanos G.E. Effects of Er:YAG laser compared to ultrasonic scaler in periodontal treatment: a 2-year follow-up split-mouth clinical study. *J Periodontol* 2007 Jul; 78(7): 1195–1200.
13. Yoshino T., Aoki A., Oda S., Takasaki A.A., Mizutani K., Sasaki K.M., et al. Long-term histologic analysis of bone tissue alteration and healing following Er:YAG laser irradiation compared to electrosurgery. *Journal of Periodontology* 2009; 80(1): 82.
14. Pourzarandian A., Watanabe H., Aoki A., Ichinose S., Sasaki K.M., Nitta H., et al. Histological and TEM examination of early stages of bone healing after Er:YAG laser irradiation. *Photomed Laser Surg* 2004 Aug; 22(4): 342–350.
15. Hibst R. Lasers for caries removal and cavity preparation: State of the art and future directions. *J Oral Laser Appl* 2002; 2: 203–211.
16. Needleman I.G., Worthington H.V., Giedrys-Leeper E., Tucker R.J. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev* 2006(2): CD001724.
17. Лукиных Л., Жулев Е., Чупрунова И. Болезни пародонта. Клиника, диагностика, лечение и профилактика. Н. Новгород: Издательство Нижегородской государственной медицинской академии 2005; 322 с.
18. Verdugo F., D'addona A. Long-term stable periodontal regeneration by means of autologous bone grafting in patients with severe periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2012 Apr; 32(2): 157–164.
19. Needleman I., Tucker R., Giedrys-Leeper E., Worthington H. A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal infrabony defects. *J Periodontol* 2002 Oct; 37(5): 380–388.
20. Pinheiro A.L., Martinez Gerbi M.E., de Assis Limeira F. Jr., Carneiro Ponzi E.A., Marques A.M., Carvalho C.M., et al. Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. *Lasers Med Sci* 2009 Mar; 24(2): 234–240.
21. Гладкова Н.Д., Карабут М.М., Киселева Е.Б., Островская Ю.В., Мураев А.А., Балалаева И.В., Фельдштейн Ф.И. Прижизненный контроль регенерации слизистой оболочки полости рта после фракционного лазерного фототермолиза методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии. *Соврем технол мед* 2012; 2: 13–19.
22. Romanos G.E., Gladkova N.D., Feldchtein F.I., Karabut M.M., Kiseleva E.B., Snopova L.B., et al. Oral mucosa response to laser patterned microcoagulation (LPM) treatment. An animal study. *Lasers Med Sci* 2013 Jan; 28(1): 25–31.
23. Hantash B.M., Bedi V.P., Kapadia B., Rahman Z., Jiang K., Tanner H., et al. In vivo histological evaluation of a novel ablative fractional resurfacing device. *Lasers Surg Med* 2007 Feb; 39(2): 96–107.
24. Корж Н.А., Дедух Н.В. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации. Ортопедия, травматология и протезирование 2006; 1: 77–84.
25. Майбородин И.В., Дровосеков М.Н., Тодер М.С., Матвеева В.А., Колесников И.С., Шевела А.И. Регенерация поврежденной кости нижней челюсти крыс на фоне введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения. *Фундаментальные исследования* 2011; 9: 264–269.
26. McDavid V.G., Cobb C.M., Rapley J.W., Glaros A.G., Spencer P. Laser irradiation of bone: III. Long-term healing following treatment by CO₂ and Nd:YAG lasers. *J Periodontol* 2001 Feb; 72(2): 174–182.
27. Friesen L.R., Cobb C.M., Rapley J.W., Forgas-Brockman L., Spencer P. Laser irradiation of bone: II. Healing response following treatment by CO₂ and Nd:YAG lasers. *J Periodontol* 1999 Jan; 70(1): 75–83.
28. Wang X., Zhang C., Matsumoto K. In vivo study of the healing processes that occur in the jaws of rabbits following perforation by an Er, Cr:YSGG laser. *Lasers Med Sci* 2005; 20(1): 21–27.
29. Queiroga A., Sousa F., Araujo J., Santos S., Sousa C.F., Quintans T., et al. Evaluation of bone repair in the femur of rats submitted to laser therapy in different wavelengths: an image segmentation method of analysis. *Laser Physics* 2008; 18(9): 1087–1091.