

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НИЖЕГОРОДСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

КАРАБУТ МАРИЯ МИХАЙЛОВНА

**ЛАЗЕРНЫЙ ФОТОТЕРМОЛИЗ
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА**

03.01.01. – радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.м.н., проф. Н.Д. Гладкова

Москва, 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1. Заболевания пародонта	12
1.1.1. Пародонтит	14
1.1.2. Нарушения пигментации	15
1.2. Общие представления о взаимодействии лазерного излучения с биологическими тканями	16
1.3. Применение лазеров в медицине	20
1.4. Абляционное и неабляционное лазерное воздействие	22
1.5. Лазерный фототермолиз	23
1.5.1. Селективный лазерный фототермолиз кожи	24
1.5.2. Фракционный лазерный фототермолиз	25
1.5.3. Механизм лазерного фототермолиза	26
1.5.4. Применение лазерного фототермолиза в практической медицине	32
1.6. Методы наблюдения структуры коллагенсодержащих тканей и их изменений, возникающих в ходе патологических процессов и их лечения	33
1.6.1. Гистологический анализ с помощью поляризационной микроскопии	33
1.6.2. Кросс-поляризационная оптическая когерентная томография	35
Глава 2. Материалы и методы исследования	41
2.1. Объекты исследования	41
2.2. Методы исследования	42
2.2.1. Лазерный фототермолиз	42
2.2.2. Кросс-поляризационная оптическая когерентная томография	43
2.2.3. Гистологический анализ	46
2.3. Методики исследования	47

2.3.1. Методика исследования заживления десны кроликов после лазерного фототермолиза	47
2.3.2. Методика исследования заживления десны человека после лазерного фототермолиза	48
2.3.3. Методика оценки возможности применения лазерного фототермолиза при лечении пародонтита у человека	48
2.3.4. Методика оценки возможности применения лазерного фототермолиза при удалении локальной гиперпигментации десны человека	50
2.3.5. Методика количественного анализа ОКТ сигнала на кросс-поляризационных изображениях десны кроликов	50
2.4. Статистическая обработка результатов	52
Глава 3. Результаты	53
3.1. Предварительное исследование строения десны кролика гистологическими методами и методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии	53
3.2. Исследование степени повреждения ткани десны экспериментальных животных после лазерного воздействия в зависимости от дозы облучения	56
3.3. Исследование динамики заживления десны кроликов и человека после лазерного фототермолиза с различной дозой облучения методами световой микроскопии и поляризационной микроскопии	62
3.3.1. Заживление десны кроликов после лазерного фототермолиза	62
3.3.2. Заживление десны человека после лазерного фототермолиза	68
3.4. Разработка методологии применения кросс-поляризационной оптической когерентной томографии для мониторинга восстановления ткани десны животных и человека после лазерного фототермолиза	71
3.4.1. Изучение процесса заживления десны кролика после лазерного	72

фототермолиза методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии	
3.4.2. Изучение процесса заживления десны человека после лазерного фототермолиза методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии	75
3.5. Разработка методологии лазерного фототермолиза для лечения патологических состояний пародонта человека	78
3.5.1. Определение чувствительности пациентов к различным режимам лазерного фототермолиза	78
3.5.2. Оценка возможности применения лазерного фототермолиза при лечении пародонтита	79
3.5.3. Оценка возможности применения лазерного фототермолиза при удалении локальной гиперпигментации десны человека	80
Глава 4. Обсуждение результатов	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
ВЫВОДЫ	95
БЛАГОДАРНОСТИ	97
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	98

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГЭ – гематоскилин и эозин

КП ОКТ – кросс-поляризационная оптическая когерентная томография

ЛФ – лазерный фототермолиз

Нитро-СТ – нитросиний тетразолий

ОКТ – оптическая когерентная томография

ПСК – пикросириус красный

СО – среднеквадратичное отклонение

УФ – ультрафиолет

ФЛФ – фракционный лазерный фототермолиз

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Исследование воздействия электромагнитного излучения оптического диапазона на биологические объекты является актуальной задачей современной биофизики, а полученные результаты широко используются в медицине. Биологическое действие света напрямую зависит от его характеристик, в первую очередь от энергии кванта, поляризации и когерентности. В связи с этим широкое применение в биологии и медицине получило лазерное излучение. Одним из факторов воздействия такого излучения является нагрев ткани, приводящий к ее термическому разрушению. Лазерное излучение позволяет выполнять локальное разрушение конкретной области ткани с минимальным повреждением окружающих областей [6, 7, 17, 98, 141, 142].

Лазерный фототермолиз (ЛФ) – микрохирургический метод локальной (точечной) деструкции ткани инфракрасным лазерным излучением. Технология заключается в том, что лазерным излучением ближнего или среднего ИК диапазона на участок ткани наносится матрица из точечных термических зон повреждения, окруженных участками жизнеспособной ткани. В результате воздействия в каждой зоне теплового повреждения происходит разрушение эпителия и коагуляция соединительной ткани. Главной особенностью такой обработки является чередование зон лазерного повреждения и неповрежденной ткани, что обеспечивает ее быструю регенерацию [127]. Вероятно, одним из первичных механизмов процесса восстановления ткани является активация белков теплового шока вокруг зон лазерного воздействия, которые вовлечены в процессы клеточной репарации [38, 91, 92].

Доказано, что использование лазерного фототермолиза стимулирует регенерацию ткани, в том числе образование нового коллагена в зонах локального (точечного) лазерного повреждения [100, 118, 165]. В связи с этим, в настоящее время данный метод широко используется в дерматологии

и лечебной косметологии для омоложения кожи и лечения кожных дефектов [107, 108]. Лазерный фототермолиз приобрел большую популярность в практической медицине благодаря высокой эффективности и минимальной инвазивности процедуры [99, 157].

Пародонтит, являющийся воспалительным заболеванием полости рта человека, представляет собой одну из наиболее значимых и сложных проблем в стоматологии [63, 67]. Современные методы лечения данного заболевания требуют хирургического вмешательства и часто сопровождаются развитием осложнений [8]. Известно, что десна и слизистая оболочка ротовой полости имеют высокий регенеративный потенциал [159]. Очевидно, что применение ЛФ на ранних этапах лечения пародонтита может стимулировать синтез нового коллагена в обработанных областях ткани, что приведет к общему клиническому улучшению состояния полости рта. Однако данный метод в лечении пародонтита до сих пор не применялся, поэтому исследование возможностей применения лазерного фототермолиза для лечения данной патологии представляет собой актуальную медико-биологическую задачу.

Важной задачей при использовании лазерного фототермолиза является оценка эффективности лечения на тканевом уровне, в частности, анализ регенерации покровного эпителия и восстановления коллагеновых волокон соединительнотканной стромы. Поскольку забор биопсийного материала десны невозможен ввиду ее склонности к рецессии (оголение корней зубов), для контроля функционального состояния ткани после лазерного воздействия необходимо использовать неинвазивные оптические методы диагностики.

Кросс-поляризационная оптическая когерентная томография (КП ОКТ) – неинвазивный метод визуализации структуры ткани на глубину до 1-2 мм с разрешением порядка 10-15 мкм. Технология основана на низкокогерентной интерферометрии в ближнем ИК диапазоне длин волн (700-1300 нм) с формированием одновременно двух изображений путем отдельной регистрации рассеянного назад излучения в двух каналах, параллельном и

перпендикулярном поляризации зондирующего излучения (изображения в ко- и кросс-поляризациях, соответственно) [10, 80, 147]. Поэтому данный метод позволяет не только прижизненно исследовать микроструктурные изменения тканей за счет оценки их рассеивающих свойств, но и контролирует состояние коллагеновых волокон, регистрируя их поляризационные свойства [12, 147]. В связи с этим, представляется перспективным использование метода КП ОКТ для мониторинга регенерации тканей полости рта после ЛФ в режиме реального времени.

Цель и задачи исследования

Цель работы состояла в разработке методологии лазерного фототермолиза для регенерации тканей слизистой оболочки животных и человека и применении метода кросс-поляризационной оптической когерентной томографии для прижизненной оценки его эффективности.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать степень повреждения ткани десны экспериментальных животных после лазерного воздействия в зависимости от дозы облучения
2. Проанализировать динамику заживления десны животных и человека после различных доз лазерного облучения
3. Разработать методологию применения кросс-поляризационной оптической когерентной томографии для мониторинга восстановления ткани десны животных и человека после лазерного фототермолиза
4. Разработать методологию лазерного фототермолиза для лечения патологических состояний пародонта человека.

Научная новизна

- Впервые проанализированы степень повреждения и динамика заживления слизистой оболочки полости рта животных и человека после лазерного фототермолиза в зависимости от дозы облучения.

- Впервые показана возможность применения метода кросс-поляризационной оптической когерентной томографии для прижизненного неинвазивного мониторинга восстановления ткани десны животных и человека после лазерного фототермолиза.
- Впервые продемонстрировано применение метода лазерного фототермолиза в качестве способа лечения пародонтита и локальной гиперпигментации десны человека.

Научная новизна и практическая значимость исследования подтверждены патентом РФ: Киселева Е.Б., Гладкова Н.Д., Сергеева Е.А., Кириллин М.Ю., Губарькова Е.В., **Карабут М.М.**, Балалаева И.В., Стрельцова О.С., Робакидзе Н.С., Масленникова А.В., Кочуева М.В. Способ оценки функционального состояния коллагенсодержащей ткани. Приоритет от 29.07.2013. Патент РФ № 2572299, опубликован 10.01.2016, приоритет от 29.07.2013

Практическая значимость

Полученные результаты могут стать основой для разработки методики лечения воспалительных заболеваний и нарушений пигментации слизистой оболочки полости рта человека с помощью лазерного фототермолиза. Метод кросс-поляризационной оптической когерентной томографии может быть использован в качестве прижизненного метода контроля заживления слизистой оболочки полости рта после лазерного воздействия, а также для выбора оптимальных параметров лазерного фототермолиза при лечении воспалительных заболеваний и нарушений пигментации слизистой оболочки полости рта как альтернатива стандартным гистологическим методам. Полученные в работе данные могут быть использованы при разработке соответствующих разделов спецкурсов и лекций по биомедицине, стоматологии и биофизике. Работа может иметь практическую ценность для врачей стоматологов (терапевтов, хирургов, ортопедов и ортодонтотв).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработана методика лазерного фототермолиза с использованием ИК лазерного облучения с длиной волны 974 нм и дозой 1.3 кДж/см² и 1.9 кДж/см² для эффективной регенерации тканей слизистой оболочки полости рта животных и человека.
2. Метод кросс-поляризационной оптической когерентной томографии позволяет прижизненно визуализировать зону лазерного повреждения слизистой оболочки полости рта и проводить мониторинг восстановления ткани после лазерного фототермолиза с различными дозами облучения.

Апробация работы

Результаты работы были представлены и обсуждены на Международных конференциях (7 докладов) и Российских конференциях (7 докладов): XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (г. Москва, 2010), III Всероссийский, с международным участием, конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010» (г. Н. Новгород, 2010), Международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пушкино, 2010, 2011, 2015), Всероссийская научная сессия молодых ученых и студентов с международным участием "Современные решения актуальных научных проблем в медицине" (г. Н. Новгород, 2011, 2013), Пятнадцатая научная конференция по радиофизике (Н. Новгород, 2011), IV Съезд биофизиков России (г. Н. Новгород, 2012), International Symposium «Topical Problems of Biophotonics-2011, 2013», Biophotonics and Imaging Graduate Summer School (Ireland, 2014), VI Троицкая конференция «Медицинская физика и инновации в медицине» (г. Троицк, 2014), 1st B3 International Conference for Young Scientists Lomonosov Moscow State University (г. Москва, 2016).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работах в изданиях, включенных в перечень ВАК.

Конкурсная поддержка работы

Проведенные исследования поддержаны проектами Федерального Агентства по Науке и Инновациям (№ 02.740.11.5149), Департамента федеральных целевых программ и проектов (№ 14.740.11.1188), РФФИ (№ 10-02-01175).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 117 страницах, включает 6 таблиц и 39 рисунков. Список литературы содержит 177 источников, из них 148 зарубежных.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Заболевания пародонта

Понятие «пародонт» включает десну (свободную и прикрепленную), периодонт, костную ткань альвеол и цемент корня зуба (рис. 1) [20].

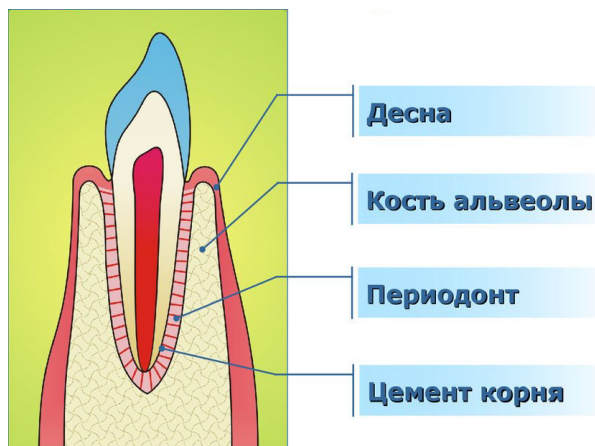
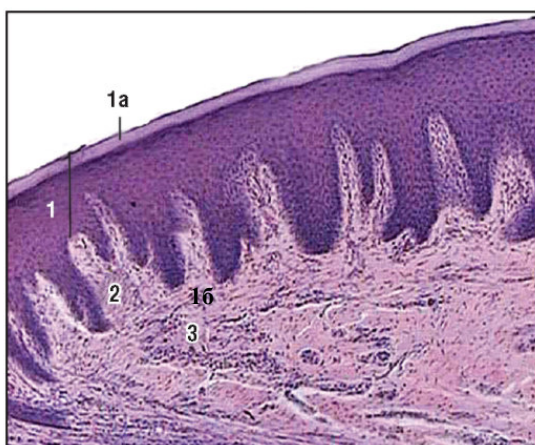


Рис. 1. Строение пародонта

Поскольку в данной работе лазерное воздействие направлено на десну, то рассмотрим особенности ее строения в норме и при воспалении.

Десна образована многослойным плоским эпителием и собственной пластинкой слизистой оболочки, подслизистый слой отсутствует (рис. 2, а). В норме эпителий десны ороговевает и содержит зернистый слой, в цитоплазме клеток которого находится кератогиалин. Ороговение эпителия десны рассматривается как защитная функция, обусловленная частым механическим, термическим и химическим раздражением. Между эпителием и соединительной тканью собственной пластинки слизистой оболочки располагается базальная мембрана, которую образуют сплетения ретикулярных волокон (рис. 2, а) [20].



а



б

Рис. 2. Нормальная десна (а) и десна при воспалении (б). 1 – многослойный плоский ороговевающий эпителий (1а - роговой слой; 1б - базальный слой); 2 - сосочковый слой соединительной ткани; 3 - сетчатый слой (плотная соединительная ткань); 4 – грубоволокнистые тяжи соединительной ткани; 5 - лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация; 6 – разрыхление, отек

Собственная пластинка десны состоит из сосочкового и сетчатого слоев. Сосочковый поверхностный слой образован рыхлой соединительной тканью с большим количеством сосудов и нервных волокон. Сетчатый слой более глубокий, представлен плотной соединительной тканью, содержащей коллагеновые волокна, пучки которых прикрепляют десну к надкостнице альвеолярного отростка. В собственную пластинку десны вплетаются пучки коллагеновых волокон – десневые волокна периодонта. Собственная пластинка десны содержит ретикулярные и эластические волокна (рис. 2, а).

Для воспаления десны (рис. 2, б), которое наблюдается при гингивите и пародонтите, характерно очаговое утолщение эпителия, сопровождающееся акантозом или паракератозом. Однако явление паракератоза также может встречаться и в здоровой десне, т.е. оно не может рассматриваться как патологический процесс [27]. В собственной пластинке десны формируются поля фиброзной соединительной ткани, иногда имеющие вид грубоволокнистых тяжей, перемежающиеся с участками выраженного

разрыхления, отека, гиперемии тканевых структур. Все это сопровождается скудной лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрацией (рис. 2, б).

Таким образом, при воспалении десны существенно меняется не только соединительная ткань, но и эпидермис. Поэтому для достижения хорошего лечебного эффекта необходимо выбирать такие параметры лазерного излучения, при которых коагуляции подвергается и эпидермис, и коллагеновые волокна собственной пластинки слизистой десны. Отметим, что основными процессами, приводящими к улучшению состояния ткани после лазерного воздействия, являются неоколлагенез и восстановление коллагена, поэтому при анализе эффективности лечения важной задачей является оценка состояния именно соединительной ткани.

1.1.1. Пародонтит

Воспалительные заболевания тканей пародонта, к которым относят пародонтит, широко распространены в практике врача-стоматолога и являются не только медицинской, но и социальной проблемой. Это обусловлено тем, что пародонтит приводит к потере зубов, а очаги инфекции в пародонтальных карманах отрицательно влияют на организм в целом.

Хронический генерализованный пародонтит является микробно-индуцированным иммунным повреждением пародонта, протекающим с нарушением свободно-радикальных механизмов в тканях, и характеризуется прогрессирующим течением с исходом в резорбцию костной ткани альвеолярного отростка [22, 21]. Клинически проявляется наличием пародонтальных (зубодесневых) карманов, выраженным воспалением тканей десны, подвижностью зубов и вертикальным типом резорбции костной ткани (рис. 3). Ему обычно предшествует гингивит (воспаление десен) и смещение бактериального спектра зубного налёта в сторону анаэробных возбудителей. В периоды обострений пародонтита утрачивается эпителиальная связка десневого кармана, происходит его углубление, в кармане скапливается десневая жидкость, нарушается связь между альвеолярной костью и периодонтальной связкой, десна становится кровоточивой [124].



Рис. 3. Ткани пародонта в норме и при пародонтите

Основными методами лечения и профилактики пародонтита являются ультразвуковая чистка зубов, т.е. удаление зубных отложений, антибактериальная и антимикробная терапия, и при необходимости хирургическое восстановление разрушенной кости. Однако данные методы являются эффективными только на ранних этапах развития заболевания, а также в качестве профилактики пародонтита [66, 136]. Все это обуславливает поиск новых методов, которые способствуют повышению эффективности лечения данной группы заболеваний.

1.1.2. Нарушение пигментации

Нарушения пигментации слизистой оболочки полости рта представляют собой поражения различной этиологии: физиологические изменения (например, расовая пигментация), как проявления системных заболеваний (например, болезнь Аддисона) и злокачественные новообразования (например, меланома и саркома Капоши) [106, 130, 132, 154].

Коричневые или более темные пигментные пятна на слизистой оболочке полости рта часто представляют эстетическую проблему, поскольку могут быть видны во время разговора или улыбки. Наиболее частой причиной гиперпигментации являются отложения меланина, располагающиеся, главным образом, в базальном слое эпителия [177].

Однако также встречаются нарушения пигментации из-за экзогенных причин, в частности, имплантации инородного тела в слизистую оболочку при различных хирургических вмешательствах [76, 89].

Традиционным подходом к лечению гиперпигментации десны служит хирургический метод, который включает удаление эпителия и пересадку свободного десневого трансплантата из другой области полости рта в область гиперпигментации. Однако описанные хирургические процедуры болезненны, дороги и имеют типичные осложнения, включающие инфекцию, образование шрамов, рецессию десны, повреждение надкостницы и кости, а также медленное заживление ран [35, 36, 156]. В мире используются альтернативные, менее травматичные способы депигментации [145], включающие эрбиевый лазер [143], CO₂ лазеры [152], криодеструкцию десны [161], лазеры в ближней инфракрасной области [177] и радиохимию [153]. Тем не менее, все существующие методики связаны со значительным дискомфортом для пациента и продолжительным временем заживления, что делает процедуру депигментации десны непривлекательной для большинства людей [151]. Поэтому остро стоит проблема разработки и применения малоинвазивных способов удаления гиперпигментации.

Таким образом, существующие методы лечения воспалительных заболеваний полости рта и нарушений пигментации достаточно инвазивны, связаны с большим дискомфортом во время процедур и с последующим долгим восстановлением, сопровождаются возникновением нежелательных побочных эффектов (отек, кровотечения, боль и др.). Поэтому разработка и внедрение в практику минимально инвазивных методов лечения данных заболеваний является актуальной задачей.

1.2. Общие представления о взаимодействии лазерного излучения с биологическими тканями

Лазер представляет собой источник света, в котором путем внешнего воздействия достигается возбуждение частиц определенного вещества (рабочего тела лазера). В отличие от тепловых источников света лазеры

обладают монохроматичностью, когерентностью, направленностью и поляризованностью излучения, а также могут перестраиваться по длинам волн и излучать импульсы короткой длительности [17]. Как известно, в результате взаимодействия лазерного излучения с биологической тканью оно может поглощаться, отражаться (или в частном случае рассеиваться) и проходить через слои ткани [6].

Отражение обусловлено скачком показателя преломления на границе биообъекта с воздухом и обратным рассеянием от различных структур ткани. Источниками рассеяния света в тканях являются отдельные внутриклеточные структуры (плазматическая мембрана, ядро, митохондрии и другие органеллы) или структурные элементы соединительной ткани (коллагеновые и эластические волокна), различающиеся по значениям показателей преломления с окружающей их биологической жидкостью — в первом случае с цитоплазмой, во втором — с внутритканевой жидкостью [167]. Глубина проникновения излучения в биоткани зависит от наличия и соотношения концентраций трех основных поглощающих хромофоров (воды, меланина и гемоглобина), длины волны, плотности мощности излучения и его временно-пространственных характеристик. Меланин является важнейшим эпидермальным хромофором, поглощающим свет достаточно равномерно во всей видимой области спектра с максимумом в ультрафиолетовой (УФ) области. Гемоглобин интенсивно поглощает световое излучение, начиная с УФ области и до длины волны 600 нм с максимумом в 585 нм. В диапазоне от 600 до 1200 нм излучение глубже проникает в ткань с минимальными потерями на поглощение и рассеяние. Специфических хромофоров с высоким коэффициентом поглощения в этом диапазоне не существует. Лазеры, применяемые в лазерной хирургии, часто работают на длинах волн, которые совпадают с максимумами спектров поглощения основных хромофоров, поскольку именно поглощение является ключевым физическим процессом, обеспечивающим эффективное взаимодействие лазерного излучения с биологическими тканями [52].

Показано, что глубина проникновения света нарастает при переходе от ультрафиолетового излучения до ближнего инфракрасного диапазона с 1 мкм до 2,5 мм, а в среднем и дальнем диапазонах резко снижается до 0,3-0,5 мм [7].

Кроме поглощения, глубина проникновения излучения в биоткани зависит от рассеяния. Рассеяние определяется разными коэффициентами преломления сред и зависит от длины волны лазерного излучения. Так, излучение эксимерного лазера ультрафиолетового диапазона (193, 248, 308 и 351 мкм), а также инфракрасное излучение 2,9 мкм эрбиевого (Er: YAG) и 10,6 мкм CO₂-лазера имеет глубину проникновения от 1 до 20 мкм. Из-за малой глубины проникновения, вызванного поглощением водой, рассеивание в слоях кератиноцитов и фиброцитов, как и эритроцитов в кровеносных сосудах играет подчиненную роль. Для света с длиной волны 450-590 нм, что соответствует линиям лазеров на аргоне и лазеров на парах меди глубина проникновения составляет в среднем от 0,5 до 3 мм. Как поглощение в специфических хромофорах, так и рассеяние играет здесь значительную роль. Лазерный луч этих длин волн хотя и остается коллимированным в центре, но он окружен зоной с высоким рассеиванием. В области спектра между 590–800 нм и более до 1320 нм также доминирует рассеивание. В этот спектр попадает большинство диодных и Nd:YAG лазеров. Максимальная глубина проникновения в кожу их излучения – до 8-10 мм [74].

В зависимости от оптических характеристик тканей (поглощения, рассеяния) возможны различные случаи распределения поглощенной энергии излучения в ткани. При слабом проникновении излучения в ткань практически вся энергия пучка поглощается в поверхностном слое ткани (не более 10 мкм) (рис. 4, а). Если излучение проникает глубоко и сильно рассеивается внутри ткани, то размеры нагреваемого объема могут превысить диаметр пучка излучения (рис. 4, б). При малом же рассеянии и меньшем поглощении излучение может проникать довольно глубоко (до 1 см) (рис. 4, в) [175].

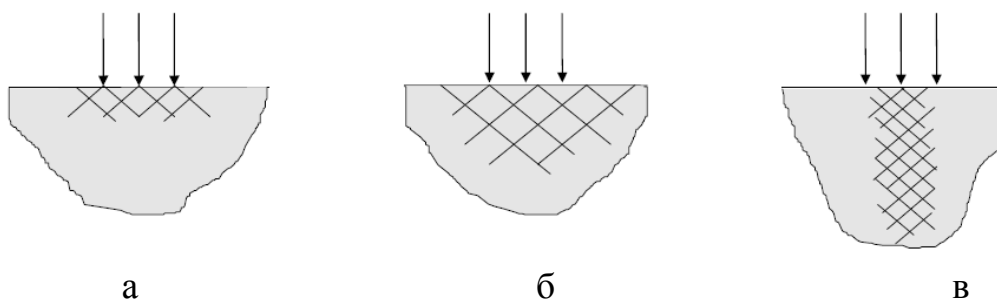


Рис. 4. Проникновение излучения в биоткань. а – лазерная хирургия, б, в – лазерная терапия

В основе разнообразных лазерных медицинских технологий лежат, по существу, два типа процессов:

- фотохимические процессы, протекающие при облучении коротковолновым излучением, вызывающим те или иные фотохимические реакции без существенного изменения температуры [98];
- термические процессы, вызванные нагревом биоткани лазерным излучением и приводящие к различным термохимическим структурным превращениям, фазовым переходам и термомеханическим эффектам [131].

Тот или иной процесс может доминировать в зависимости от параметров лазерного воздействия и от типа (состава) биоткани. Области существования различных типов взаимодействия лазерного излучения с биотканями определяются тремя связанными параметрами: плотностью мощности, плотностью энергии и длительностью лазерного воздействия [4].

Дальнейшие процессы, происходящие в ткани после преобразования лазерной энергии в тепловую, зависят от температуры нагрева. В первую очередь, при достижении 45-60°C, происходит ингибирование ферментов. Когда температура ткани возрастает до 65—80°C, происходит денатурация, а затем и коагуляция белков, которая необратимым образом меняет структуру и свойства белков и сопровождается обезвоживанием и высыханием как клеток, так и межклеточной жидкости. Когда ткань нагревается до 100°C и

выше, происходит вапоризация (испарение) ткани путем почти мгновенного вскипания внутриклеточной воды, при этом твердая ткань преобразуется в газообразный пар и дым. Перегрев ткани (т.е. нагрев до 165—250°C) и выпаривание ведут к образованию карбонизированных остатков. Такой процесс носит название карбонизации. При импульсном нагреве ткани может наблюдаться процесс абляции[6].

Таким образом, лазерное излучение обладает рядом уникальных свойств, определяющих результат его взаимодействия с биологическими тканями (высокую монохроматичность, временную и пространственную когерентность, направленность, поляризованность, значительные интенсивность и яркость излучения, сверхкороткую длительность импульсов генерации и способность к перестройке длины волны). Его взаимодействие с биотканью носит сложный характер и определяется как параметрами лазерного излучения (длина волны, интенсивность, режим облучения и т.д.), так и параметрами объекта (структурой, степенью пигментации, наличием кровеносных и лимфатических сосудов и т.д.). Поэтому выбор источника лазерного излучения для конкретной клинической задачи должен быть адекватен для ее решения.

1.3. Применение лазеров в медицине

Лазеры, применяемые для медицины, можно разделить на три класса: для диагностики, для терапевтического и хирургического лечения [7].

В настоящее время *низкоинтенсивное лазерное излучение* (не более 100 мВт/см²) эффективно используется в медицине для проведения *терапевтических процедур* (облучение открытых ран, воспалительных процессов, патологических очагов и др.). При таком лазерном облучении значительно снижается риск возникновения побочных эффектов. Доказано влияние низкоинтенсивного излучения на тонус мозговых сосудов, на повышение резистентности организма и антиоксидантной защиты, стимулирующее действие на микроциркуляцию, выраженное

обезболивающее, седативное и иммунокорректирующее действие, на уменьшение хронической и острой боли различной этиологии [9, 45].

Методы *лазерной макро- и микродиагностики* обладают высокой чувствительностью, значительным пространственным разрешением и универсальностью. Они используются для ранней диагностики рака, катаракты, различных заболеваний крови, определения скоростей кровотока в сосудах, подвижности бактерий и др. При микродиагностике используют методы линейной и нелинейной лазерной спектроскопии, а при макродиагностике - методы рассеяния, интерферометрию, голографию [26].

Применение *лазеров в хирургии* основано на необратимых процессах - испарении, коагуляции и абляции тканей [135]. Наиболее удобными для практики оказались лазеры среднего инфракрасного диапазона (в частности СО₂-лазер, с длиной волны 10,6 мкм). Излучение такого лазера практически полностью преобразуется в тепло в достаточно тонком поверхностном слое ткани (глубина проникновения не более 10 мкм). Они успешно используются в общей хирургии, онкологии, оториноларингологии, дерматологии, и стоматологии. Для хирургии мягких тканей часто используются неодимовый лазер (длина волны 1,064 или 1,320 мкм), гольмиевый лазер (длина волны 2,1 мкм), туллийевый лазер (длина волны 1,96 мкм) и эрбиевый (длина волны 2,94 мкм) [73, 93, 138, 162]. Однако проникая в ткань на глубину около 1 см, излучение таких лазеров дает довольно широкую линию разреза и повышенную зону некроза вследствие рассеяния части излучения [25].

Преимущества лазера во время операции заключаются в возможности проводить точечные хирургические вмешательства, при которых риск кровотечения сводится к минимуму, так же значительно сокращается время самой процедуры. При использовании лазера происходит одновременная дезинфекция тканей, благодаря чему уменьшается вероятность инфицирования, которая является самым распространенным осложнением после хирургического вмешательства. Потребность в местной анестезии значительно снижается, а отсутствие боли после лазерной операции

доставляет пациентам больше комфорта, а также сокращает время хирургических процедур. После лазерной хирургии раны заживают намного быстрее, уменьшается возможность появления послеоперационного дискомфорта и отеков [61].

Таким образом, благодаря своим преимуществам лазеры нашли применение в различных областях медицины таких, как хирургия, стоматология, офтальмология, дерматология, онкология, нейрохирургия, урология. При этом отличие в параметрах лазерного излучения ведет к отличию в механизме и результатах взаимодействия, обеспечивая лазерам широкое поле деятельности для решения различных медицинских задач.

1.4. Абляционное и неабляционное лазерное воздействие

Общепринято разделять лазерные технологии на абляционные и неабляционные [18, 141]. Под лазерной абляцией понимают ликвидацию участка живой ткани под непосредственным воздействием лазерного излучения. Механизм и параметры абляции определяются свойствами ткани, характеристиками излучения (длиной волны, непрерывным или импульсным режимом облучения, мощностью лазера, энергией в импульсе, суммарной поглощённой энергией и т.д.) и коэффициентом поглощения данного вида излучения в конкретном виде ткани или в её отдельных составляющих[6].

Для абляционных методик используются CO_2 (длина волны 10,6 мкм) и эрбиевые лазеры (2,94 мкм), поскольку излучение таких лазеров очень хорошо поглощается водой, оно взаимодействует даже с тем небольшим количеством воды (10-15%), который содержится в эпидермисе, что приводит к незначительной ширине области повреждения [142].

Длина волны эрбиевых лазеров, используемых для неабляционных методик, колеблется от 1,4 до 1,55 мкм. За счет того, что такое излучение меньше поглощается водой, оно может проникать глубже и поглощаться в дерме. При этом возможно поверхностное охлаждение эпидермиса, что минимизирует риск его повреждения и связанных с этим последующих осложнений [18, 128].

Многочисленные исследования доказывают, что использование абляционного CO₂ лазера для задач косметологии и дерматологии дает хорошие и прогнозируемые результаты [53, 150, 173]. Однако такое лечение связано со значительными побочными эффектами, включающими длительное время реабилитации, эритему (длится в среднем 4,5-9 месяцев), инфекции различного генеза, временные и постоянные дисхромии (гипер- и гипопигментации), рубцевание. Особенно проблематичной может стать гипопигментация, поскольку она может проявиться через 1 год после лечения и стать необратимой [54]. Это требует снижения длительности или количества проводимых процедур, что в свою очередь приводит к недостаточным клиническим результатам [32, 133].

Эрбиевый лазер для абляционной лазерной обработки (2,94 мкм) стал использоваться как альтернатива углекислотному лазеру. После воздействия таким светом происходит более быстрое заживление, однако данное излучение имеет меньшую глубину оптического проникновения, соответственно, меньшую зону абляции и коагуляции, по сравнению с CO₂ лазером, что приводит к снижению эффективности процедуры даже в случае прохождения нескольких сеансов лечения [87, 88].

1.5. Лазерный фототермолиз

Потребность в разработке как можно менее инвазивного лазерного лечения с минимальными побочными эффектами и высокой эффективностью существовала много лет.

Лазерный фототермолиз – это такое воздействие на ткань, при котором ее разрушение происходит на участке, содержащем хромофор, за счет превращения энергии лазерного излучения в тепловую. При этом нагрев соседних с разрушенным участком зон минимален [28].

Методы лазерного фототермолиза, к которым относятся селективный и фракционный лазерный фототермолиз, были разработаны для задач косметологии и дерматологии, в частности, как микроскопические методы омоложения кожи [81, 127].

1.5.1. Селективный лазерный фототермолиз

Селективный лазерный фототермолиз основан на принципе пространственно избирательного поглощения света специфическими хромофорами (оксигемоглобин, меланин) на длинах волн, которые совпадают с максимумами спектров поглощения этих веществ. Свет поглощается хромофорами, вызывает нагрев и денатурацию коллагена, выделение медиаторов воспаления, которые инициируют процесс восстановления ткани, включающий синтез I и III типов коллагена. Селективный фототермолиз по существу является неабляционным методом лазерной обработки. При использовании короткоимпульсных лазерных устройств с меньшей длительностью импульса, чем время термической релаксации нагретой области (содержащей хромофоры), эффект лазерного повреждения избирательно ограничен только областью с высоким поглощением хромофоров, диффузия тепла в окружающие ткани при этом минимальна [37]. Импульсные источники света излучают монохроматический и некогерентный свет, при этом специальные фильтры позволяют выбирать длины волн в диапазоне 0,515—1,200 мкм. Длительность импульса может меняться с учетом диаметра содержащей хромофор области и связанного с размером времени его термической релаксации. В большинстве современных инструментов генерируется свет с изменяющейся длительностью импульса, что позволяет выбрать наиболее эффективный режим. Технологию импульсных источников света многие авторы рассматривают как наилучший способ неабляционного селективного фототермолиза [144]. Селективный лазерный фототермолиз наиболее эффективен на начальных стадиях старения кожи. Он улучшает текстуру кожи, значительно уменьшает поверхностную дисхромиию, но относительно слабо обновляет коллаген, недостаточно уменьшает поверхностные морщины и слабо влияет на вялость кожи. С другой стороны, этот метод имеет низкий риск побочных эффектов, короткий период выздоровления

(непосредственно или через несколько часов после обработки) и не требует высокой квалификации лазерных хирургов [32].

1.5.2. Фракционный лазерный фототермолиз

В 2004 Manstein и соавторы представили новую концепцию для лазерного фототермолиза, названную фракционным (ФЛФ). Она заключается в создании несообщающихся микротермических зон повреждения определенных размеров, окруженных зонами неповрежденной ткани (рис. 5). За счет сохранения зон неповрежденной ткани целостность эпителия восстанавливается за счет его быстрой реэпителизации. Это резко сокращает время заживления [127, 172].

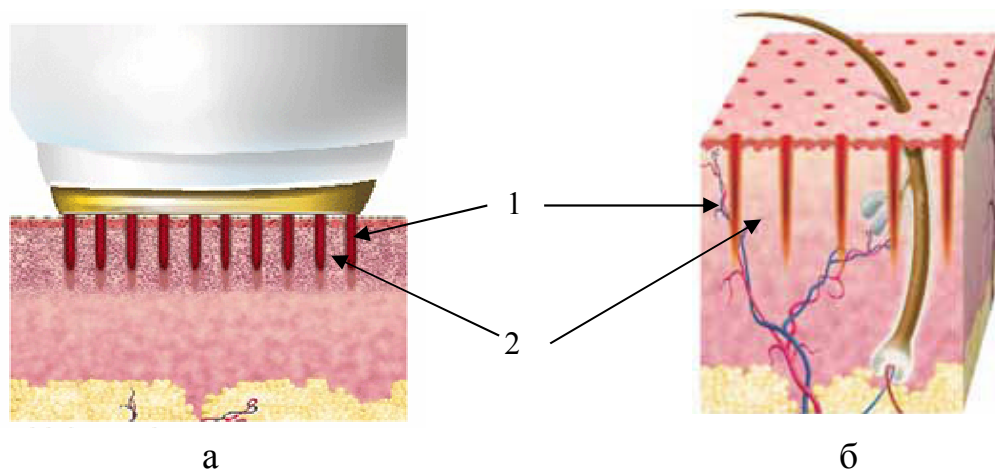


Рис. 5. Концепция фракционного лазерного фототермолиза. 1 – микротермические зоны повреждения, 2 – зоны неповрежденной ткани.

Первым фракционным устройством, одобренным U.S. Food and Drug Administration для клинического применения в дерматологии, был лазер Fraxel SR750 (Reliant Technologies), который состоял из эрбиевого лазера с волоконной доставкой, излучающего на длине волны 1,550 мкм [34]. Наконечник с диаметром 7 мм или 15 мм прикладывается к предварительно обработанной анестетиком коже, создавая матрицу зон термического повреждения с коэффициентом заполнения от 5 до 50%. В дополнение к местной анестезии используется локальное охлаждение, которое служило для обезболивания и сохранения эпидермиса [72, 118].

Альтернативно может быть использован лазер с фракционной доставкой StarLux® fractional handpiece, который присоединяется к лазерной платформе StarLux (Palomar Medical Technologies). Система использует лазер с длиной волны 1,55 мкм в режиме 1,5 импульса в секунду. В матрице микропучков диаметром 10 мм достигается энергия 70 мДж/микропучок. За один импульс может быть создан массив колонок 100 микропучков/см² с глубиной коагуляции 1,5 мм. В наконечник встроено контактное охлаждение, которое защищает поверхность кожи и уменьшает связанную с обработкой боль [99, 169].

1.5.3. Механизм лазерного фототермолиза

Научная концепция, лежащая в основе ЛФ, заключается в применении микроскопических пучков точечного, сильно сфокусированного света, которые вызывают малые фокальные зоны повреждения в ткани [165]. Однако, мало что известно о биологических механизмах, приводящих к полному восстановлению ткани без рубцевания и практически без побочных эффектов [97].

Предполагается, что контролируемый температурный стресс эпидермиса и дермы при лазерном повреждении стимулирует регенерацию и репарацию кожи, активируя реэпителизацию и ремоделирование коллагена [95]. Считается, что именно неоколлагенез является причиной долговременного улучшения, заключающегося в увеличении плотности кожи и разглаживании морщин. Нагревание ткани при лазерном облучении приводит к денатурации коллагена, т.е. к разрушению водородных связей в третичной спиральной структуре коллагеновых волокон, и последующему формированию случайной спирали [54].

Известно, что при нагревании ткани происходит активация белков теплового шока (HSP), что по всей видимости является одним из первичных базовых изменений, происходящих на молекулярном уровне, помимо изменений регуляции других молекул, таких как трансформирующий фактор

роста β (TGF- β), матричные металлопротеиназы, гиалуронатсинтетазы, гиалуронидазы и гиалуроновая кислота [38, 91, 139, 155, 174].

Белки HSP – это стрессовые белки, которые активируются во всех типах клеток, подвергшихся тепловому или другим видам физического и химического стресса. Они усиливают способность клеток бороться с накоплением поврежденных (неправильно свернутых) белков, одновременно с этим облегчая их рефолдинг (повторное сворачивание полипептидной цепи в нормальную пространственную структуру), или участвуя в синтезе новых белков с целью замещения поврежденных. Таким образом, белки HSP вовлечены в фундаментальные процессы клеточной репарации и в процесс заживления ран [39, 117]. Показано, что лазерное воздействие усиливает экспрессию белка HSP70 в эпидермисе вокруг микротермических зон повреждения (через 2-48 часов после процедуры) и в структурах дермы, в частности, вокруг кровеносных сосудов, волосяных фолликулов и сальных желез [119]. Интересно отметить, что при неабляционном лечении эрбиевым лазером максимальный уровень экспрессии данного белка был ниже и достигался позже по сравнению с абляционным CO₂ - лазером [94, 96].

Известно, что в грануляционной ткани заживающей раны преобладает коллаген III типа [116]. По мере заживления накапливается более жесткий коллаген I типа, в то время как количество коллагена III типа снижается. Выявлено, что экспрессия белка HSP47, который, главным образом, участвует в процессе синтеза и транспорта про- α 1(I) и про- α 2(I) цепей проколлагена I, усиливается к 4-7-му дню после лазерного лечения и остается постоянной в течение 3-х месяцев, способствуя, тем самым, усиленному накоплению проколлагена и коллагена I и III типов [95, 125, 134]. В работе Helbig и соавторов показано, что к 14 дню наблюдается частичное или полное (в зависимости от уровня приложенной энергии) заполнение микротермических зон вновь синтезированным конденсированным проколлагеном III [95].

Некоторые исследования показали индукцию или активацию факторов роста TGF- β при различных видах неабляционного лазерного лечения через 2-14 дней после облучения [38]. Важно отметить, что эти факторы роста способствует синтезу компонентов матрикса, таких как фибронектин и коллаген, трансформации миофибробластов, иммуномодуляции, ангиогенезу и реакции теплового шока [77, 90, 112].

Также одними из важных ферментов, катализирующих первый этап расщепления коллагена, являются матричные металлопротеиназы (ММП), уровень которых повышается в первые 3 дня после обработки, достигая максимума к 7-му дню и снижаясь в течение 2х последующих недель. Аналогичную динамику имел уровень ММП, которые расщепляют уже частично расщепленный коллаген и другие белки матрикса, такие как протеогликаны и эластин [134]. Существуют доказательства, что ММП вовлечены не только в расщеплении, но и в ремоделирование вновь синтезирующегося коллагена, которое происходит на поздних стадиях заживления ран. Показано, что уровень некоторых ММП возрастает в замедленном темпе, достигая максимума к 14-му дню после лечения и оставаясь слегка повышенным на 28-й день после лечения [168].

Гистологические исследования кожи после неабляционного ЛФ показали, что непосредственно после воздействия наблюдается некроз как соединительной ткани, так и эпидермиса. Несмотря на это, роговой слой остается неповрежденным. Быстрая реэпителизация (в течение первых 24 часов) происходит за счет миграции кератиноцитов и выдавливания поврежденных эпидермальных компонентов на периферию зоны термического повреждения. Кроме того, практически сразу после воздействия в области микротермических зон наблюдаются морфологические изменения клеток базального слоя, связанные с их переходом в мигрирующие клетки, способные перемещаться к зоне воздействия и способствовать быстрой реэпителизации [127, 165].

На рисунке 6 показан процесс заживления кожи после неабляционного лазерного фототермолиза длиной волны 1550 нм и энергией в импульсе 15 мДж (рис. 6).

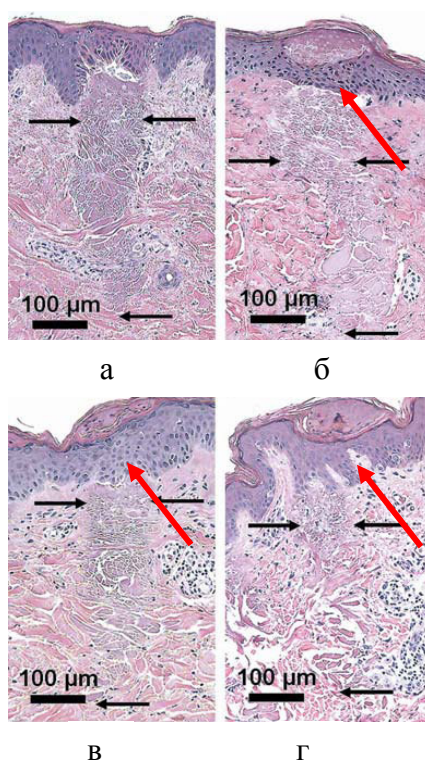


Рис 6. Заживление кожи после неабляционного лазерного фототермолиза. а – сразу после воздействия, б – через 1 день, в – через 3 дня, г – через 7 дней. Окраска ГЭ. Черными стрелками обозначена области лазерных колонок. Красными стрелками обозначены микроскопические эпидермальные некротические остатки [99].

Через 1 день после лечения (рис. 6, б) над зоной повреждения (отмечена черными стрелками на рисунке) наблюдалось образование микроскопических эпидермальных некротических остатков (отмечены красными стрелками на рисунке), содержащих клетки эпидермиса и дермы с признаками теплового повреждения. Через 3 дня после лечения (рис. 6, в) уплотнение из остатков эпидермиса и дермы почти полностью покрывало восстановленный эпидермис. Через 7 дней после лечения (рис. 6, г) эти остатки начинали отслаиваться вместе с роговым слоем. При этом полное восстановление ткани происходит к 30 дню после воздействия [99].

На рисунке 7 показан процесс заживления после абляционного лазерного фототермолиза длиной волны 10600 нм и энергией в импульсе 20 мДж.

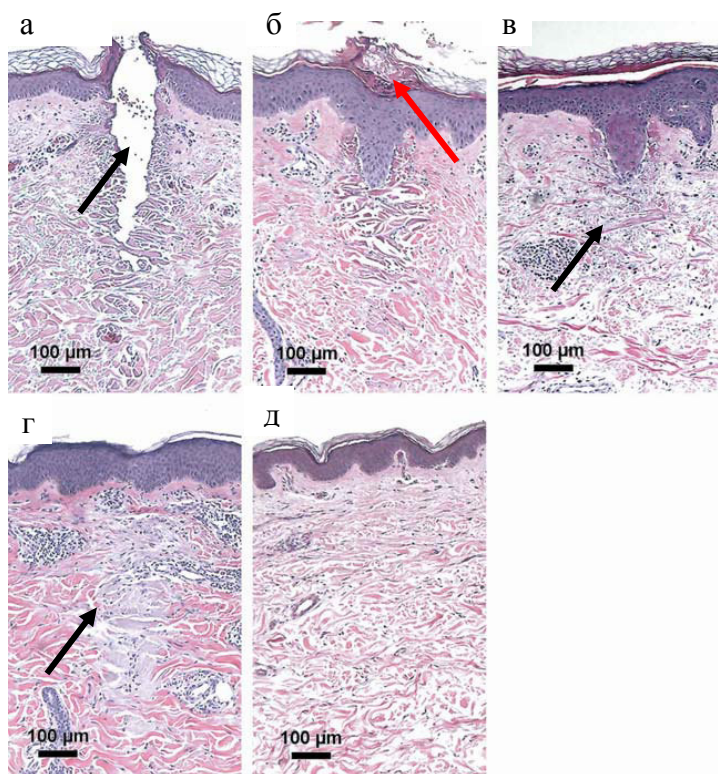


Рис. 7. Заживление кожи после абляционного лазерного фототермолиза. а – сразу после воздействия, б – через 2 дня, в – через 7 дней, г – через месяц, д – через 3 месяца. Окраска ГЭ. Черной стрелкой обозначена зона лазерного повреждения. Красной стрелкой обозначены микроскопические эпидермальные некротические остатки [99].

Сразу после воздействия (рис. 7, а) четко видна зона абляции эпидермиса и дермы (обозначена черной стрелкой на рисунке). Через 2 дня (рис. 7, б) происходит инвагинация эпидермиса и начало образования эпидермальных некротических остатков (отмечены на рисунке красной стрелкой) на поверхности зоны лазерного повреждения. Через 7 дней после лечения (рис. 7, в) эпидермис полностью восстанавливается, а эпидермальные некротические остатки отслаиваются вместе с роговым слоем. В течение одного месяца после лечения (рис. 7, г) зона повреждения все еще четко визуализируется в дерме. Однако через 3 месяца (рис. 7, д)

никаких следов воздействия или нежелательных побочных эффектов не обнаруживается [99].

В других работах [92] также было показано, что разрушенное вещество дермы включается в так называемые микроскопические эпидермальные некротические остатки, которые мигрируют в эпидермис и, в конечном счете, элиминируются через роговой слой.

Эффекты воздействия ЛФ на эпидермальный пигмент представляют особый интерес, поскольку некоторые из используемых в настоящее время неабляционных лазерных систем, работающих в инфракрасном спектре, приводят к уменьшению скопления пигмента в эпидермисе без его полного удаления [102]. Традиционная абляционная лазерная шлифовка полностью удаляет базальный слой, в котором содержатся меланоциты, что может привести к необратимой гипопигментации кожи [165]. Одним из важных достоинств неабляционного ЛФ является сведение к минимуму возникновения побочных эффектов у пациентов с более темным типом кожи из-за минимального повреждения эпидермиса [62]. Еще в классической работе Manstein и соавторов было продемонстрировано минимальное изменение пигмента после ЛФ при низких и средних плотностях микротермических зон при обработке у пациентов с темной кожей. Гистологическое исследование показало, что существует хорошо контролируемый механизм перераспределения меланина, использующий в качестве транспортного средства микроскопические эпидермальные некротические остатки. Дальнейшие исследования данного аспекта ЛФ привело к новым концепциям для лечения состояний, характеризующихся пигментными нарушениями [85, 86, 111].

Учитывая выявленный механизм удаления остатков поврежденной ткани через эпидермис и последующее восстановление зон повреждения, предположили, что ЛФ может обеспечить уникальный терапевтический эффект на оздоровление кожи при ряде заболеваний или наличии кожных дефектов [34].

1.5.4. Применение лазерного фототермолиза в практической медицине

В настоящее время на практике используется как абляционный, так и неабляционный лазерный фототермолиз. Данная методика успешно применяется для удаления и коррекции различных эстетических недостатков или кожных дефектов, таких как послеоперационные шрамы, атрофические рубцы от угревой сыпи, морщины, нарушения пигментации [99, 105, 104, 123, 176].

В работе Manstein и соавторов впервые были представлены результаты воздействия лазерного фототермолиза на кожу предплечья и морщины вокруг глаз с помощью прототипа устройства для ФЛФ с длиной волны 1,5 мкм. Через 3 месяца после обработки у 34% пациентов было отмечено значительное уменьшение или разглаживание морщин, а у 47% пациентов – умеренное улучшение текстуры кожи предплечья. При этом глубина образующихся микротермических зон составила 300-400 мкм, их диаметр – 100 мкм, а расстояние между ними – от 250 мкм и больше [127]. Стоит отметить, что глубина и диаметр микротермических зон определяется энергией лазерного луча и могут быть скорректированы в зависимости от клинических задач [109].

Неабляционный ФЛФ является эффективной методикой для разглаживания морщин, лифтинга (подтягивания) кожи, омоложения, общего улучшения состояния кожи, лечения нарушения пигментации и атрофических рубцов. Эту методику лучше всего применять в тех случаях, когда планируется заметный результат без интенсивного воздействия и длительного реабилитационного периода [165].

Внедрение абляционных методик лечения позволило сократить время реабилитации и побочные эффекты по сравнению с традиционной абляционной лазерной шлифовкой кожи при сохранении высокой эффективности процедуры.

В 2007 году Hantash и соавторы описали первый опыт применения абляционного лазерного фототермолиза для фотоомоложения с

использованием устройства на основе CO₂ лазера, которое создает сетку из микротермических зон повреждения настраиваемой плотности и глубины. При этом абляция и коагуляция дермы и эпидермиса, включая роговой слой, происходит только в пределах микротермических зон. В работе показано, что устойчивое ремоделирование коллагена происходит в течение 3 месяцев после лечения [91]. При неабляционном ФЛФ для данного процесса достаточно 30 дней [119].

Хотя многие исследования показали преимущества неабляционного ФЛФ, заключающиеся в минимальном развитии побочных эффектов и меньшем времени заживления [31, 33, 40, 58, 70, 75, 164], следует учитывать, что такая обработка оказывается менее эффективной даже в случае прохождения нескольких сеансов лечения, чем абляционная лазерная шлифовка CO₂ и Er:YAG лазерами. Внедрение технологии абляционного лазерного фототермолиза привело к уменьшению времени восстановления после процедуры (по сравнению с классической обработкой), а также снижению риска возникновения дополнительных рубцов и пигментных нарушений. Абляционный ФЛФ показал большой потенциал при лечении серьезных косметических дефектов – рубцов различного происхождения и глубоких морщин [41, 43, 71, 78, 110, 121, 149].

1.6. Методы наблюдения структуры коллагенсодержащих тканей и их изменений, возникающих в ходе патологических процессов и их лечения

1.6.1. Гистологический анализ с помощью поляризационной микроскопии

Гистологические методы оценки коллагена хорошо известны. Классической окраской тканевых срезов при гистологическом исследовании методом световой микроскопии является гематоксилин – эозин, позволяющий оценить общее строение ткани, при этом все волокна монохромны. Специфические окраски позволяют дифференцировать структуры. Окраска по Ван-Гизону дифференцирует мышечные волокна (темно-коричневый цвет), ядра (черный), коллагеновые волокна (зрелые и

толстые – темно-красный цвет; молодые – розовый, тонкие – желто-оранжевый). Однако не во всех случаях волокна коллагена дифференцируются надежно [3, 24].

Метод световой поляризационной микроскопии при скрещенных поляризаторе и анализаторе предоставляет дополнительные возможности, которые еще более увеличиваются при использовании окраски пикросириусом красным (ПСК), которая позволяет надежно выделять такие двулучепреломляющие структуры биоткани, как коллаген, из окружения. Многочисленными исследователями показано, что волокнистая соединительная ткань, окрашенная ПСК, в поляризованном свете выявляется цветами от красного до зеленого. Метод окраски ПСК в комбинации с поляризационной микроскопией является наиболее приемлемым высококонтрастным методом визуализации коллагеновых волокон [57, 126, 158]. При этом интенсивность свечения отражает степень организации коллагена, которая прямо связана с его поляризационными характеристиками [101]. В исследовании L. Borges и соавторы показано, что разрушенные коллагеновые волокна слабо окрашивались ПСК, и в поляризованном свете выявлялись тонкими, бледными и зеленоватыми, т.е. обладали слабым двулучепреломлением [55]. Таким образом, использование окраски ПСК позволяет судить о функциональном состоянии ткани.

ПСК является гистохимической окраской, которая впервые была использована в 60-х годах как надежный метод выявления отложений амилоида в тканях человека. ПСК, являясь сильным кислым красителем, реагирует через свои сульфидные группы с группами оснований, присутствующими в молекуле коллагена, и встраивается на уровне их третичной структуры. Удлиненные молекулы красителя располагаются при этом параллельно молекулам коллагена, делая окраску еще более выраженной [137, 158].

Считается, что ПСК специфичен для нескольких типов коллагена (I, III, IV, V). Большинство исследователей считает, что коллаген I типа на срезах в

поляризованном свете выглядит желтым или желто-красным, а коллаген III типа – зеленым. I и III типы коллагена преобладают в организме и составляют соответственно 80% и 15-20% от общего количества коллагена, синтезируемого фибробластами. В ряде исследований с помощью окраски ПСК определяли количество коллагена I типа в сухожилии; выявляли коллаген I и III типов при инфекционном гепатите; изучали соотношение коллагенов I и III типов в легких [163].

Известно, что интенсивность свечения окрашенных ПСК препаратов, отражает концентрацию коллагена, а цвет коррелирует с типом коллагена и размером волокон [101]. Группа исследователей Giattina и соавторы показала, что уровень сигнала на изображениях поляризационно-чувствительной оптической когерентной томографии (ПЧ ОКТ) коррелируют с яркостью свечения коллагена, оцененного методом ПСК в поляризованном свете [82]. Кроме того, в нашей работе также было подтверждено, что уровень сигнала в кросс-поляризации на изображениях кросс-поляризационной оптической когерентной томографии хорошо соотносится с интенсивностью свечения коллагена, выявленного при окраске пискросириусом красным в поляризованном свете [11, 12].

1.6.2. Кросс-поляризационная оптическая когерентная томография

Среди прижизненных методов для оценки процессов повреждения и заживления тканей после лазерного воздействия наиболее целесообразно применить оптическую когерентную томографию (ОКТ), и, в частности, ее поляризационную модификацию – КП ОКТ, с помощью которой, как ожидается, можно наиболее эффективно оценивать динамику изменения соединительной ткани при регенерации ткани после ЛФ по изменению ОКТ сигнала в кросс-поляризации от коллагеновых волокон.

ОКТ основана на интерференционном приеме и измерении рассеянного назад зондирующего низкокогерентного (широкополосного) инфракрасного света в зависимости от времени его распространения в среде. Продольное (в глубину) разрешение в изображениях ограничено шириной спектра

источника света, поперечное (боковое) разрешение определяется остротой фокусировки света оптической системой и может достигать аналогичных величин [80, 84].

ОКТ представляет интерес для клинического использования по ряду причин. Информация о ткани, получаемая с помощью ОКТ, является прижизненной и позволяет визуализировать внутреннюю структуру ткани на глубину 1-2 мм с достаточно высоким разрешением (10-15 мкм). Метод ОКТ неинвазивен, поскольку использует излучение в ближнем инфракрасном диапазоне с мощностью порядка 3-5 милливатт и не оказывает повреждающего воздействия на организм. ОКТ с высокой надежностью (приближающейся к 100 %) отличает нормальную ткань от патологической. Так, диагностическая точность ОКТ в диагностике неоплазии (включая ранние формы) составляет 81-91% [42]. ОКТ используется для выявления патологических процессов, визуализируя внутреннюю структуру тканей глаза, кожи, слизистых оболочек и сосудов [42].

В основе действия ОКТ во временной области лежит измерение времени задержки световой волны, отраженной от исследуемой ткани. Источником излучения в современных приборах ОКТ является широкополосный суперлюминесцентный светодиод. В ходе исследования световая волна делится на две компоненты, при этом одна из них отражается от исследуемого объекта, а другая (опорная), от специального отражающего зеркала (рис. 8, а). Затем прибор суммирует отраженные сигналы, и при условии равенства оптических путей, пройденных обратно рассеянными волнами в плечах интерферометра, наблюдается их интерференция и регистрируется ОКТ-сигнал. Профиль амплитуды интерференционного сигнала по аналогии с ультразвуковым исследованием, получил название А-скана (рис. 8, б). При сканировании в поперечном направлении из одномерных А-сканов можно получить двумерное распределение неоднородностей – В-скан или ОКТ-изображение.

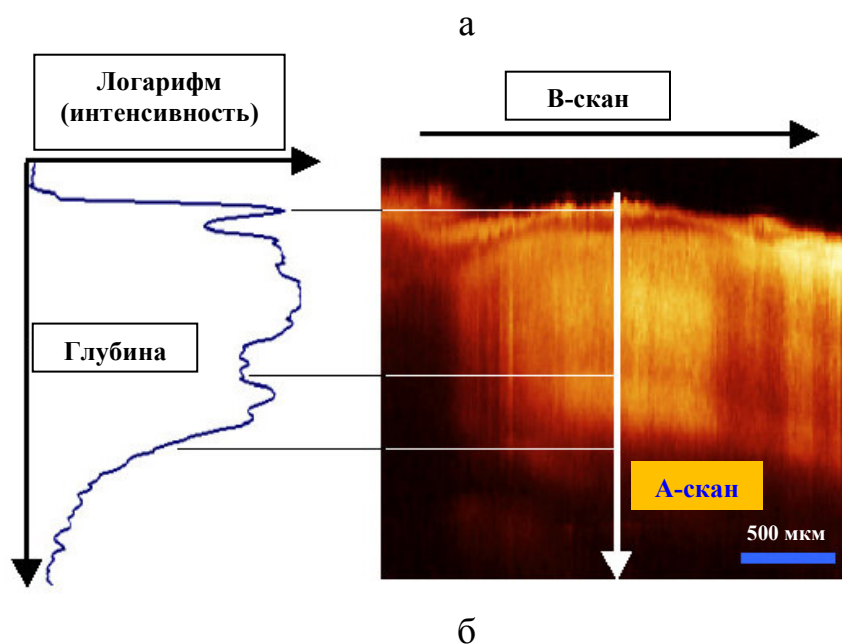
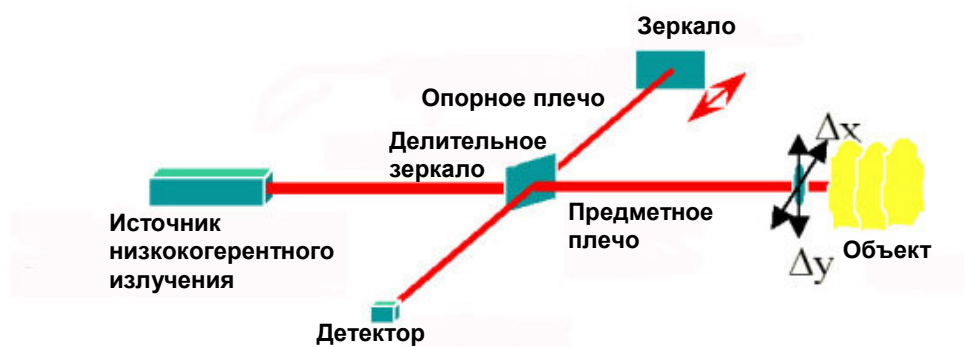


Рис. 8. Схема интерферометрии для оптической когерентной томографии (а) и пример полученного ОКТ-изображения в позитивной желто-коричневой палитре (б)

Известно, повреждающее воздействие, как и патологические состояния, меняя свойства и целостность здоровых тканей, меняют их поляризационные свойства (двулучепреломление и кросс-рассеяние). Именно по этой причине перспективным и надежным методом является использование поляризационной ОКТ для выявления изменения структуры ткани после лазерного воздействия, в частности, кросс-поляризационной ОКТ (КП ОКТ) [42, 46-49].

КП ОКТ формирует одновременно два изображения путем отдельной регистрации рассеянного излучения в двух каналах, параллельном и перпендикулярном поляризации зондирующего излучения (изображения в

ко- и кросс-поляризациях, соответственно). В кросс-поляризации рассеянное излучение может появиться как в результате двулучепреломления, так и в результате кросс-поляризационного рассеяния, обусловленного кросс-рассеянием излучением – процессом рассеяния в биоткани на отдельных оптических неоднородностях с изменением на кросс-поляризацию [115, 114]. Под двулучепреломлением света понимают разделение световой волны в анизотропных тканях на две ортогонально поляризованные компоненты (обыкновенную и необыкновенную оси), распространяющиеся с разными скоростями [23, 29]. Величина двулучепреломления является характеристикой вещества и может быть определена по измеренной на выходе из вещества оптической разности хода между обыкновенным и необыкновенным лучами (фазовой задержки). Среди факторов, которые влияют на двулучепреломление биотканей, можно выделить молекулярную организацию и молекулярную концентрацию, химический состав молекул (к примеру, тип коллагена), действие повреждающего излучения (лазерного, радиационного) и другие факторы. Двулучепреломление присуще таким высокоорганизованным молекулам как: коллаген, кератин, кристаллы холестерина, комплексы актина и миозина, волокнам миелина и другим [56, 64, 65].

Впервые экспериментальные установки, исследующие кросс-рассеяние зондирующего излучения при взаимодействии с биотканью (КП ОКТ), были описаны и использованы в 1998 году в работе нашей группы при исследовании твердых тканей зуба [11, 12] и J.M. Schmitt на модели кожи. В данной работе использован универсальный прибор, созданный в ИПФ РАН (г. Нижний Новгород), который реализует оба метода поляризационной ОКТ – КП ОКТ и ПЧ ОКТ. Прибор позволяет визуализировать ОКТ изображения как в ко-, так и в кросс-поляризации. Получение и последующее сравнение двух изображений поперечной структуры рассеяния в биологической ткани – в обеих поляризациях - является основой метода КП ОКТ [115, 114, 148].

Пилотные исследования нашей группы по изучению КП ОКТ изображений здоровой слизистой оболочки полости рта и десны показали, что метод эффективно отображает особенности структуры слизистой оболочки полости рта разной локализации [11, 12, 84].

КП ОКТ изображение демонстрирует слоистое изображение неороговевающей слизистой оболочки щеки как в ко-, так и кросс-поляризации - горизонтально ориентированные слои эпителия и соединительной ткани, содержащей высокоорганизованный коллаген, от которого в кросс-поляризации наблюдается высокий сигнал (рис. 9, а). Это подтверждается гистологическими данными, полученными при окрашивании пикросириусом красным с оценкой в поляризованном свете (рис. 9, б), который фиксирует только высокоорганизованный коллаген [12].

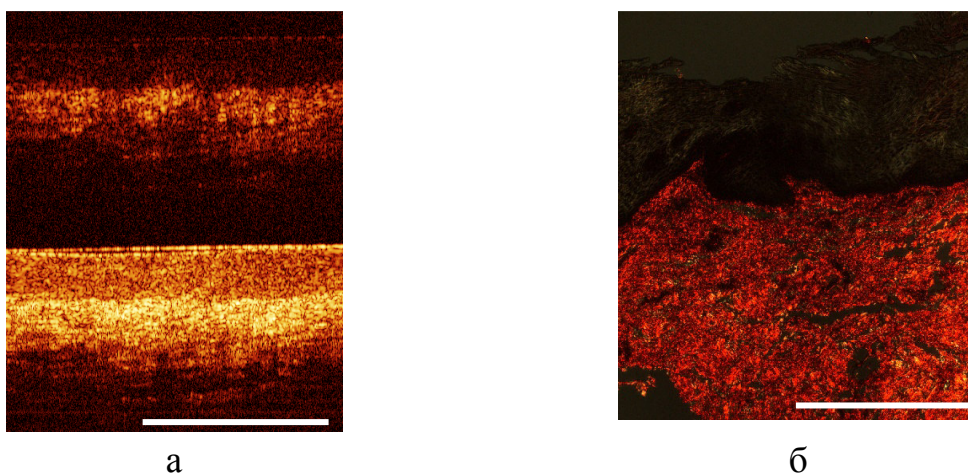


Рис. 9. Слизистая оболочка щеки в норме: КП ОКТ изображение (а); соответствующий гистологический препарат, окраска ПСК (б). Бар 1 мм [12].

КП ОКТ изображения здоровой прикрепленной десны показали, что в ко-поляризации (рис. 10, а) ороговевающий эпителий не дифференцируется от соединительнотканной стромы, т.к. сосочки стромы имеют вертикальную ориентацию (рис. 10, б), что лишает изображение привычной для слизистой оболочки слоистой структуры. В кросс-поляризации (рис. 10, а) обнаруживается сигнал от сосочков стромы, состоящих из вертикально ориентированных коллагеновых волокон преимущественно I типа, которые обладают кросс-рассеиванием света. Это также подтверждается

гистологическими данными, полученными при окрашивании препарата пикросириусом красным с оценкой в поляризованном свете (рис. 10, б) [12].

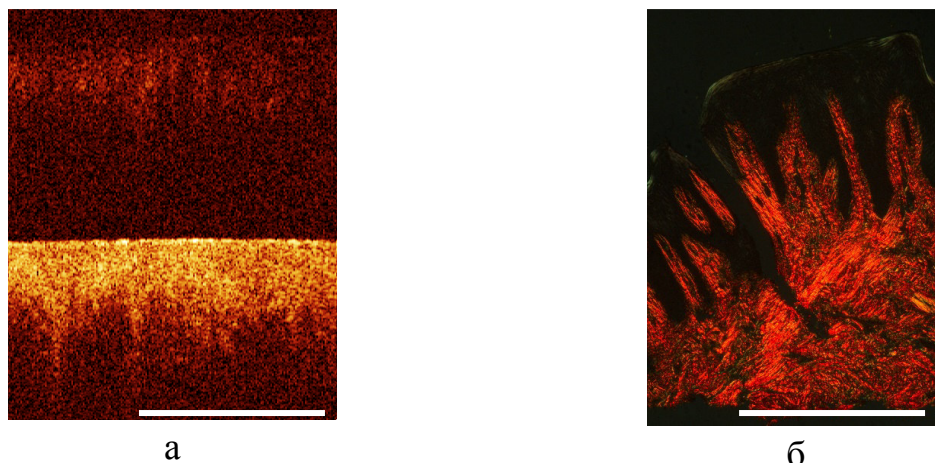


Рис. 10. Слизистая прикрепленной десны в норме: КП ОКТ изображение (а); соответствующий гистологический препарат, окраска ПСК (б). Бар 1 мм [12].

Таким образом, возможности метода позволяют применить КП ОКТ как метод прижизненного мониторинга заживления ткани после фототермолиза.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования служила десна верхней и нижней челюсти кроликов и человека. Процессы повреждения и заживления изучались на визуально и морфологически здоровой десне кролика и человека.

Все исследования разрешены Этическим комитетом ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России (Протокол №1 от 11.01.2010 г.). Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие перед облучением.

2.1.1 Животные. Эксперименты по изучению процессов заживления ткани после фототермолиза выполнены на здоровых кроликах породы шиншилла обоего пола массой 3-4 кг. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном режиме светового дня и свободном доступе к воде и пище. Всего в работе использовано 18 животных. При проведении исследований 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.).

2.1.2. Пациенты. В исследование включены пациенты в возрасте от 18 до 54 лет:

- 2 здоровых добровольца для определения уровня боли в зависимости от дозы лазерного облучения (длительности лазерного импульса).
- 6 пациентов, которым по медицинским показаниям удалялась ткань десны (при хирургических операциях или установке имплантатов), для изучения процессов заживления десны после лазерного фототермолиза.
- 33 пациента с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степени тяжести для оценки возможности применения лазерного фототермолиза для лечения воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта. Постановка диагноза осуществлялась

на основании данных клинического и рентгенологического обследования. В исследовании не участвовали пациенты, принимавшие системные антибиотики в течение последних трех месяцев, и имеющие противопоказания к местному обезболиванию.

- 1 пациент с очагами локальной гиперпигментации на десне верхней челюсти для оценки возможности применения лазерного фототермолиза для удаления пигментных пятен. Очаги гиперпигментации представляли собой несколько коричневых пигментных пятен неправильной формы, не выступающих над поверхностью и не вызывающих неприятных ощущений у пациента.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Лазерный фототермолиз

Работа выполнена с использованием оригинальной лазерно-стоматологической системы компании «Dental Photonics Inc.» (США). Внешний вид установки представлен на рис. 11.

Лазерное устройство имеет следующие технические характеристики:

- диодный лазер с оптоволоконной системой доставки;
- длина волны излучения - $974\text{нм} \pm 10\text{нм}$, выходная мощность – 20 Вт;
- импульсный режим излучения длительностью единичного лазерного импульса от 50 до 250 мс;
- сапфировый наконечник цилиндрической формы – диаметр 400 мкм

Лазерное излучение поступает в наконечник по оптоволоконному кабелю. Для создания лазерных колонок наконечник прикладывается непосредственно к ткани и нажатием педали подается излучение.

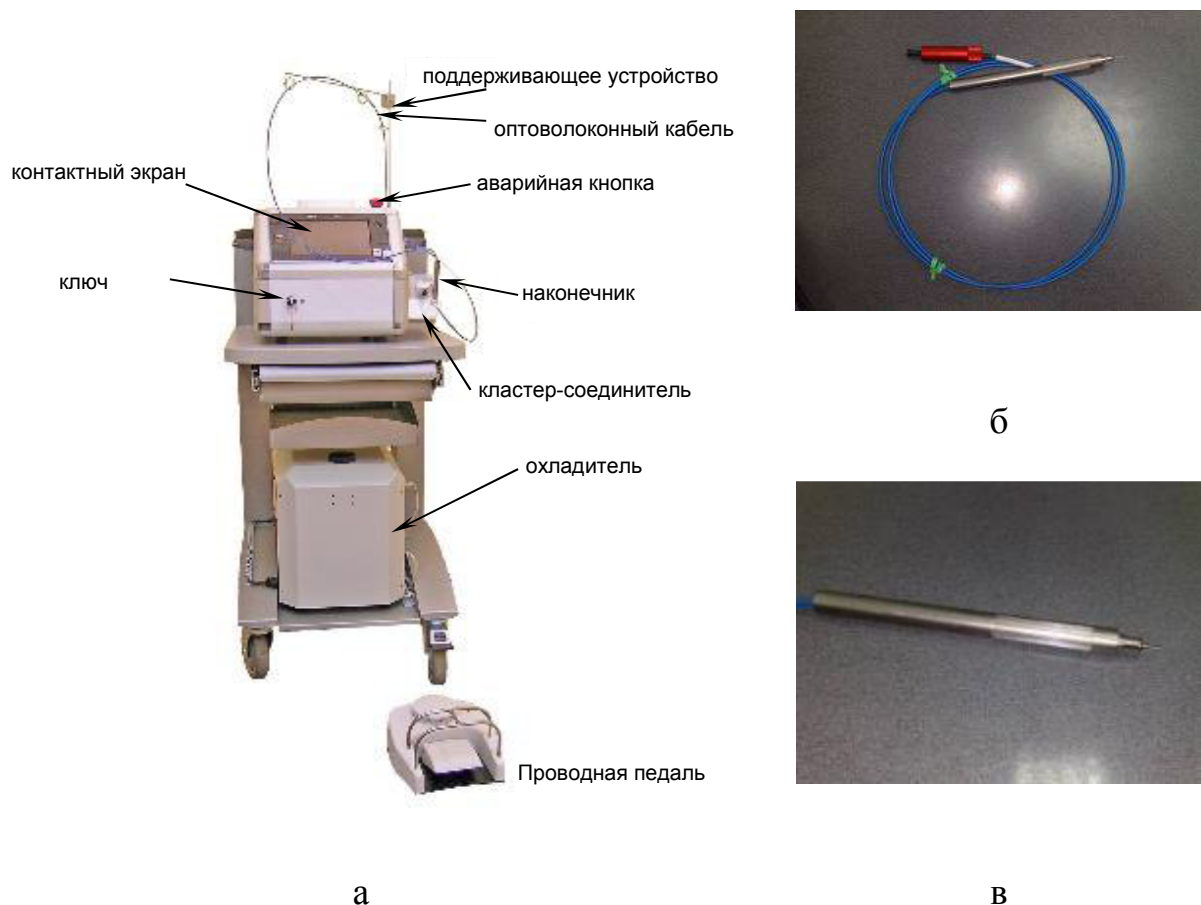


Рис. 11. Лазерно-стоматологическая система компании «Dental Photonics Inc.»: а - внешний вид, б - система доставки лазерного излучения с наконечником, в - лазерный наконечник.

2.2.2. Кросс-поляризационная оптическая когерентная томография

Для прижизненного исследования повреждения и динамики заживления десны кроликов и человека после ЛФ использовался кросс-поляризационный оптический когерентный томограф «ОКТ 1300-У» (рис. 12, а). Прибор разработан в ИПФ РАН (г. Нижний Новгород, Россия) и оснащен торцевым эндоскопическим зондом, наружный диаметр которого составляет 2,7 мм (рис. 12, б, в). В КП ОКТ устройстве используется зондирующее излучение с длиной волны 1300 нм и мощностью 3 мВт. Разрешение для данного прибора по глубине составляет 15 мкм, поперечное разрешение - 25 мкм.

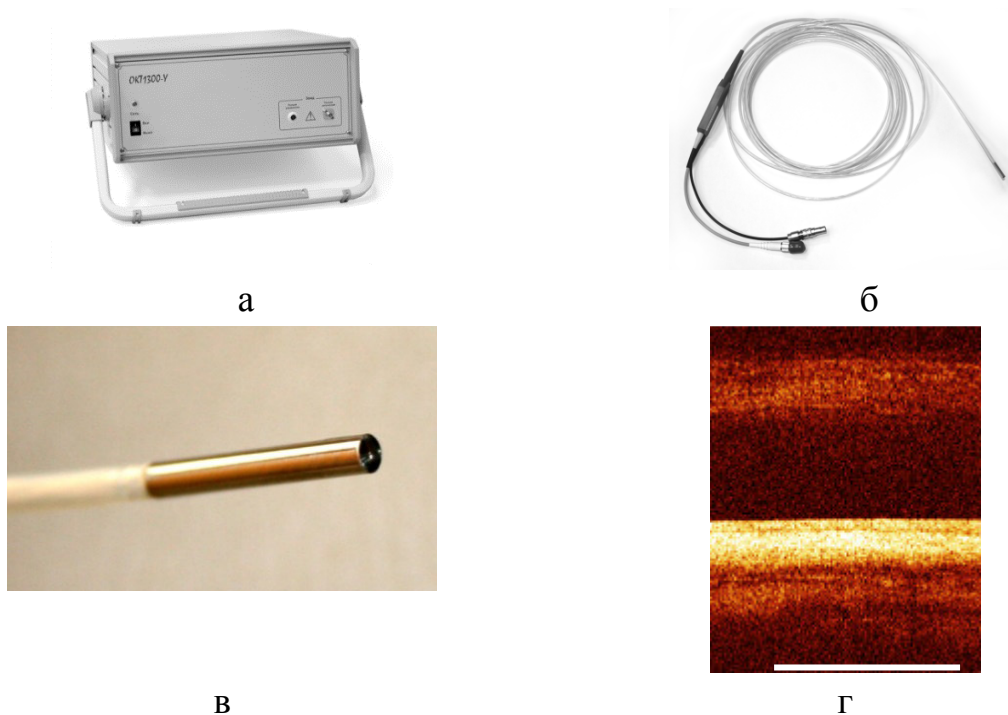


Рис. 12. Кросс-поляризационный оптический когерентный томограф: а – внешний вид прибора, б – эндоскопический зонд, в – ОКТ-микрозонд с торцевым окном, г – типичное ОКТ изображение здоровой десны кролика

Прибор имеет два канала и одновременно демонстрирует два сопряженных изображения (рис. 12, г): нижнее – в ко-поляризации и верхнее – в кросс-поляризации со строгим взаимным соответствием пространственного расположения элементов изображений. Каждое КП ОКТ изображение регистрируется в течение 2 секунд и имеет следующие характеристики: 200x512 пикселей, размер 2x2,3 мм [80].

Оптическая схема установки КП ОКТ томографа, использованного в работе, представлена на рисунке 13. Отличительной особенностью схемы является общий путь для опорной и зондирующей волн («common path» оптическая схема на изотропном волокне [10]), поскольку опорное отражение организуется на дистальном конце гибкого оптического зонда.

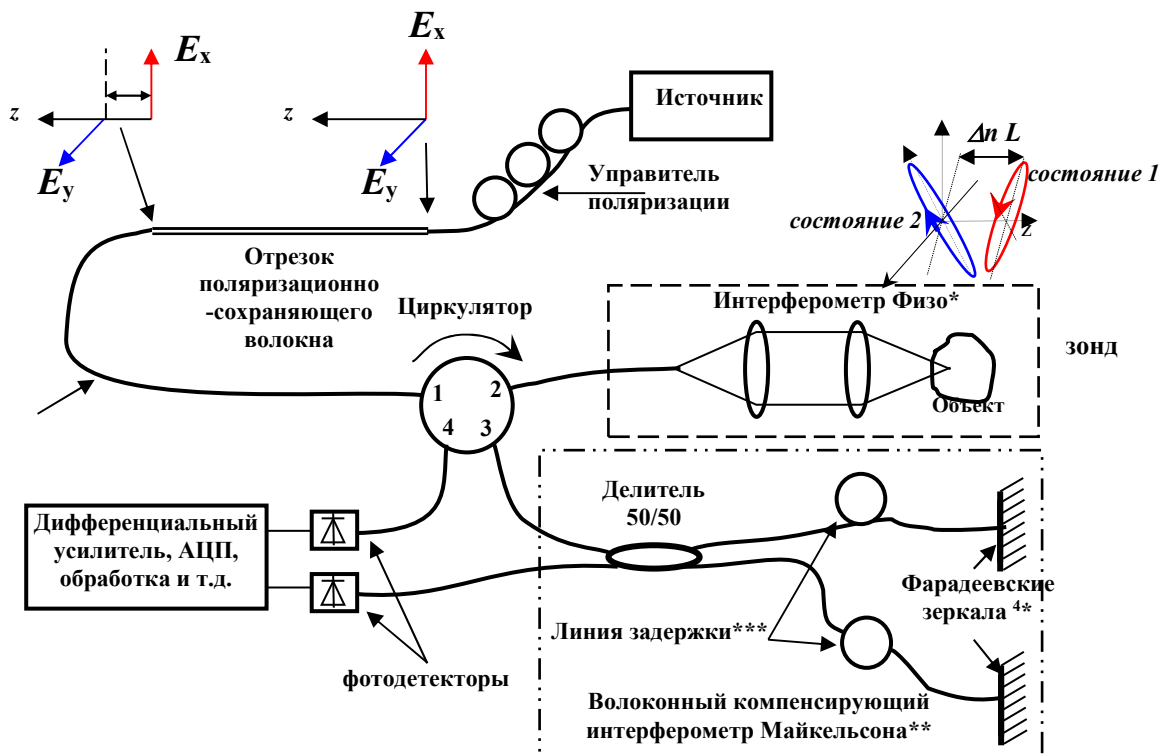


Рис. 13. Функциональная схема кросс-поляризационного оптического когерентного томографа «ОКТ1300-У».

*интерферометр Физо – интерферометр, одна грань которого образуется торцом волокна на дистальном конце зонда, а другая – отдельным рассеивателем в ткани.

**Волоконный интерферометр Майкельсона используется для компенсации большой длины интерферометра Физо (технологическая особенность) и для упрощения процесса сканирования по глубине.

***совокупность длинных кусков волокна, намотанных на пьезопластину. Используется для сканирования задержкой по глубине и получения ОКТ изображения в одной вертикальной строке.

⁴*Фарадеевские зеркала – устройства, поворачивающие отраженную поляризацию на 90° относительно падающей. Используются для компенсации искажений поляризации в волокне

Источником частично поляризованного низкокогерентного излучения с центральной длиной волны 1300 нм в КП ОКТ приборе служит суперлюминесцентный диод, ширина спектра излучения по уровню $\frac{1}{2}$ максимальной величины (FWHM) составляет около 70-100 нм. Ткань сканируется светом, который является комбинацией двух ортогональных

поляризационных состояний с исходно заданной разницей оптических путей ΔL , при этом обе пробные ортогональные волны взаимно когерентны.

В приборе реализован прием волн на один фотоприемник, разделение рассеянных назад волн с ко- и с кросс-поляризациями происходит за счет задержки во времени. Далее сигналы проходят стадии аналоговой и цифровой обработки, после чего визуализируются на дисплее персонального компьютера.

При этом сначала формируется набор А-сканов отдельно для разных поляризаций, затем два двумерных ОКТ-изображения в исходной и ортогональной поляризациях (В-сканы) объединяются в одно КП ОКТ изображение со взаимным соответствием пространственного расположения элементов изображений. Направление сверху – вниз на каждом изображении соответствует увеличению глубины наблюдения. Для получения двумерных ОКТ-изображений в приборе применяется оптомеханическая система сканирования в поперечном направлении.

В результате на изображении в ко-поляризации строится картина рассеяния, зависящая только от оптических неоднородностей и регулярного двулучепреломления. Сигнал на изображении в кросс-поляризации обусловлен не только преобразованием состояния поляризации в результате двулучепреломления, но и кросс-рассеянием (на 90°) на мелкомасштабных неоднородностях, а также ориентацией выделенных структур биоткани относительно осей зондирующих волн. По соотношению сигналов ко- и кросс-каналов можно судить о состоянии анизотропных и других изменяющих поляризацию компонентов биоткани.

2.2.3. Гистологический анализ

С целью определения степени повреждения и заживления ткани после лазерного воздействия был проведен гистологический анализ тканей десны после ЛФ методами световой и поляризационной микроскопии. Для анализа скальпелем вырезалась вся область десны, на которой были нанесены колонки.

Материал, фиксированный в 10% нейтральном формалине, проводили по спиртам восходящей концентрации и двум порциям хлороформа, а затем заливали в парафин, учитывая правильную ориентировку ткани. Приготовленные с помощью санного микротома Leica SM 2000 R гистологические срезы толщиной 5 мкм после депарафинизации окрашивали гематоксилин и эозином (ГЭ) и пикросириусом красным (ПСК).

Для определения размеров лазерных колонок и визуализации зоны лазерного повреждения использовали окрашивание нитросиним тетразолием. Данный краситель используется для определения жизнеспособности и функциональной активности ткани. Срезы для окрашивания (толщиной 40-50 мкм) получали после быстрой заморозки взятого образца до -15-17°C и резке на криостате. На препаратах, окрашенных нитро-СТ, визуализируется зона уменьшенного или отсутствующего окрашивания, соответствующая зоне ингибирования ферментов, наступающего при меньших температурах, чем коагуляция белков соединительной ткани.

2.3. Методики исследования

2.3.1 Методика исследования заживления десны кроликов после ЛФ

В качестве премедикации кроликов применялся Рометар внутримышечно из расчета 5 мг/кг. Для эвтаназии животных использовалось внутримышечное введение трехкратной терапевтической дозы Золетила из расчета 100 мг/кг.

Для нанесения колонок была выбрана десна верхней челюсти справа и слева от резцов. Для изучения морфологических особенностей строения здоровой десны кроликов был проведен забор материала десны верхней челюсти и его окрашивание ГЭ и ПСК.

Перед проведением ЛФ визуально оценивался исходное состояние десны животного (на наличие ран) и создавалась цифровая фотография. Затем проводилось контрольное КП ОКТ-исследование областей, на которые в последствие наносились лазерные колонки.

Прижизненная лазерная обработка десны проводилась справа и слева от резцов. Для ЛФ использовались длительности единичного лазерного импульса 80 мс, 120 мс, 150 мс и 250 мс. Плотность энергии составила 1.3 кДж/см², 1.9 кДж/см², 2.5 кДж/см² и 4.2 кДж/см² соответственно. Плотность мощности для каждой длительности импульса составила 16.6 кВт/см². Лазерные колонки наносились в ряд по 3 штуки вдоль резца. После ЛФ животные наблюдались с 1 по 90 сутки. Для оценки заживления ткани на 0 (непосредственно после облучения), 1-7, 12, 20 и 90 сутки проводилось КП ОКТ-исследование каждой колонки в отдельности, десна с нанесенными колонками фотографировалась и забиралась на гистологическое исследование. На каждый срок забирались образцы у одного животного. Образцы десны подвергались гистологическому анализу для изучения процессов заживления ткани после ЛФ. Полученные препараты сравнивались с ОКТ-изображениями для оценки состояния коллагеновых волокон в области лазерного повреждения.

Сроки забора на гистологию выбраны с учетом классических этапов заживления ран.

2.3.2. Методика исследования заживления десны человека после ЛФ

Для исследования заживления после ЛФ на десну наносилось от 1 до 4 лазерных колонок с дозой облучения 2.5 кДж/см². Перед процедурой ЛФ пациентам проводилось местное обезболивание. До воздействия проводилось контрольное КП ОКТ-исследование области воздействия. Пациенты наблюдались с 1 по 90 сутки, в 0, 3, 20 и 90 сутки наблюдения область воздействия фотографировалась, проводилось КП ОКТ исследование области каждой колонки и область воздействия на гистологическое исследование.

2.3.3. Методика оценки возможности применения лазерного фототермолиза при лечении пародонтита у человека

Перед началом проведения процедуры ЛФ для минимизирования неприятных ощущений человека определялся уровень боли в зависимости от длительности лазерного импульса (дозы облучения). Облучение проводилось

при длительностях лазерного импульса 50-150 мс с шагом 10 мс. Во время обработки анестезия не использовалась.

Длительность импульса при нанесении колонок соответствовала определенным болевым ощущениям. Для определения уровня боли, которую добровольцы испытывали при ЛФ, регистрировались болевые ощущения согласно шкале, разработанной компанией Dental Photonics Inc. (Табл. 1).

Таблица 1.

Сравнительный масштаб боли для лазерных исследований

Баллы	Боль/Дискомфорт	Описание
0	Нет боли	Комфортное состояние
1	Едва заметная	а – Покалывание
		б - Комариный укус
2	Слабая причиняет боль интенсивности, которую Вы можете легко терпеть	а – Маленький порез/царапанье (порез бумагой),
		б - Мгновенный удар из рогатки
3	Умеренная причиняет боль заметной интенсивности, которую Вы, однако, готовы терпеть	а - Жало пчелы
		б - Подобно эпиляции
		в - Средняя зубная боль
4	Сильная причиняет боль настолько интенсивную, что Вы не желаете продолжать обработку	а – Многократные ужаления пчелой
		б - Ограниченный ожог от горячей духовки/гриля

Для оценки клинической эффективности ЛФ для лечения пародонтита у пациентов лазерному воздействию подвергалась десна с щечной стороны около всех зубов. Перед началом проведения процедуры пациентам проводилась профессиональная гигиена полости рта. Воздействие осуществляли равномерно единичными лазерными импульсами с дозой 1.3 кДж/см² (в 1 мм от свободного края десны) и 1.9 кДж/см² (на уровне дна пародонтального кармана). Точки воздействия были распределены по обрабатываемому участку равномерно. При этом результирующая площадь лазерного поражения составляла 30-40 %. При лазерной обработке

регистрировался уровень боли/дискомфорта, который не должен был превышать уровня 2а (табл. 1).

Для оценки эффективности ЛФ перед началом лечения и через 3 месяца после его окончания врачом контролировались такие клинические параметры, как:

1. Глубина пародонтальных карманов (ГПК) - измеряется глубина карманов как расстояние от десневого края до дна зубодесневого кармана измеряется пародонтальным зондом в шести точках в области каждого зуба: 3 измерения с вестибулярной, 3 измерения с язычной (небной) поверхности.
2. Клинический уровень прикрепления (КУП) - расстояние от цементно-эмалевой границы до дна пародонтального кармана (самого глубокого участка) в мм. КУП не измеряется, а рассчитывается исходя из ГПК.

2.3.4. Методика оценки возможности применения лазерного фототермолиза при удалении локальной гиперпигментации десны человека

Обработка очагов пигментации проводилась облучением с дозой 1.3 кДж/см². Процедура проводилась без анестезии. Фактор заполнения лазерными колонками очага пигментации составлял около 30%. Через две недели проводилась повторная обработка без использования анестезии с тем же фактором заполнения. Цифровые фотографии создавались до процедуры, непосредственно после воздействия и в последующие осмотры (примерно раз в неделю после каждой обработки). Необработанные пигментные пятна использовались для сравнения яркости и цвета обработанных.

2.3.5. Методика количественного анализа ОКТ сигнала на кросс-поляризационных изображениях десны кроликов

Для объективизации визуальных критериев КП ОКТ изображений в данной работе был проведен количественный анализ ОКТ сигнала на кросс-поляризационных изображениях. Было обработано 57 КП ОКТ изображений.

В отличие от большинства технологий визуализации с низким уровнем шума, ОКТ основана на интерференционной картине и всегда содержит значительные (до 100%) пространственные модуляции сигнала, связанные со структурой спеклов (шум). При этом яркость каждого пиксела на изображении несет информацию об истинном сигнале от объекта и случайно возникших в этой точке спеклах [19]. Поэтому для количественной оценки ОКТ-изображений было выбрано среднеквадратичное отклонение (СО) ОКТ-сигнала.

Среднеквадратичное отклонение (СО) яркости ОКТ-сигнала – отношение СО для информативных пикселей (т.е. их сигнал превышает уровень шума) в кросс-поляризации, к СО для тех же пикселей в ко-поляризации. Рассчитывается по формуле [19]:

$$\delta\sigma = \frac{\sigma^{\perp} \left|_{I_{I}^{\perp} > \langle I_{\text{фон}} \rangle + 2s_{\text{фон}}}\right.}{\sigma^{\parallel} \left|_{I_{I}^{\parallel} > \langle I_{\text{фон}} \rangle + 2s_{\text{фон}}}\right.},$$

где: σ^{\parallel} - среднеквадратичное отклонение ОКТ-сигнала в исходной поляризации, для пикселей, где яркость ОКТ-сигнала превышает среднюю величину фонового ОКТ-сигнала $\langle I_{\text{фон}} \rangle$ на его удвоенное стандартное отклонение $2s_{\text{фон}}$,

σ^{\perp} - среднеквадратичное отклонение ОКТ-сигнала в ортогональной поляризации для пикселей, где яркость ОКТ-сигнала превышает среднюю величину фонового ОКТ-сигнала $\langle I_{\text{фон}} \rangle$ на его удвоенное стандартное отклонение $2s_{\text{фон}}$.

Нахождение отношения двух значений, вычисленных по кросс- и ко-поляризациях существенно уменьшает зависимость получаемой количественной характеристики от параметров прибора, в том числе и от уровня шума. Использование СО сигнала для характеристики ОКТ изображения было применено в ряде работ [14, 19, 83, 120].

На каждом КП ОКТ изображении измерялось СО ОКТ сигнала в кросс-поляризации в области локального лазерного повреждения (рис. 15, б) и в

аналогичной области до воздействия (рис. 15, а). Для измерения СО ОКТ сигнала выделялась прямоугольная область, соответствующая размеру колонки, измеренному на гистологическом препарате, т.к. 1) колонка по форме представляет собой микротоннель, с практически вертикальными стенками, зауженный в нижней части, 2) морфологические данные говорят об относительно равномерном распределении коллагеновых волокон в строме десны в норме и при патологиях. Вычисления проводились в программе ImageJ.

2.6. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программах MS Excel 2003 и BioStat 2009. Определяли средние значения (M) измеряемых величин и стандартные отклонения (\pm SD). Достоверность различий между группами оценивалась с использованием параметрического критерия Стьюдента ($p \leq 0.05$).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Предварительное исследование строения десны кролика гистологическими методами и методом КП ОКТ

В ходе предварительного исследования были выяснены особенности строения областей десны вблизи резцов, на которые впоследствии наносились колонки. Десна состоит из двух отделов – свободной (располагается между соседними зубами) и прикрепленной (альвеолярной) (покрывает альвеолярный отросток челюсти) (рис. 14).

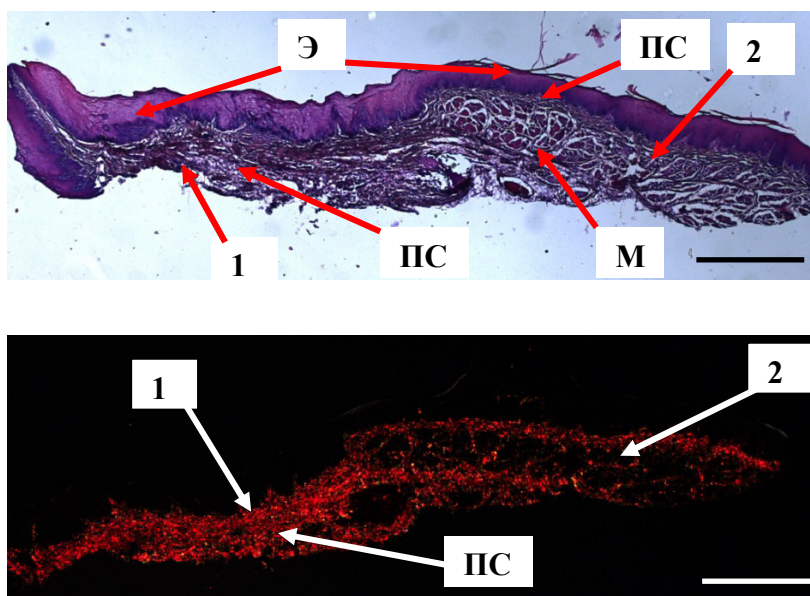


Рис. 14. Строение здоровой десны верхней челюсти кролика: а – окраска ГЭ, б – окраска ПСК с оценкой в поляризованном свете. 1 – свободная десна (левая часть препарата), 2 – прикрепленная (альвеолярная) десна (правая часть препарата). Э – эпителий, ПС – подслизистый слой, М – мышца. Бар 1 мм.

Многослойный плоский эпителий, покрывающий оба отдела десны, является ороговевающим, однако степень ороговения эпителия свободной десны выше, чем альвеолярной слизистой. Толщина эпителия свободной десны составляет 300-500 мкм, альвеолярной - 100-200 мкм. Подслизистый слой свободной десны толстый (более 500 мкм), глубже расположены слюнные железы, у альвеолярного отдела - тонкий (100-150 мкм), непосредственно под ним расположена мышца (рис. 14, а). Анализ препаратов десны, окрашенных ПСК, показал, что подслизистый слой

состоит из организованного коллагена I типа, который дает яркое красное свечение в поляризованном свете (рис. 14, б).

Выявленные отличия в морфологическом строении свободной и прикрепленной десны позволили заключить, что при нанесении лазерных колонок на свободную десну будет повреждаться эпителий и подслизистый слой, в то время как воздействие на прикрепленную десну может также затронуть и мышцы, поэтому в работе анализу подвергались колонки, нанесенные на свободную десну.

Метод КП ОКТ рассматривается как прижизненный метод контроля процессов заживления после ЛФ. Поэтому были изучены особенности ОКТ сигнала на изображениях в ко- и кросс-поляризациях областей для ЛФ воздействия десны верхней челюсти (до взятия на гистологический анализ) (рис. 15).

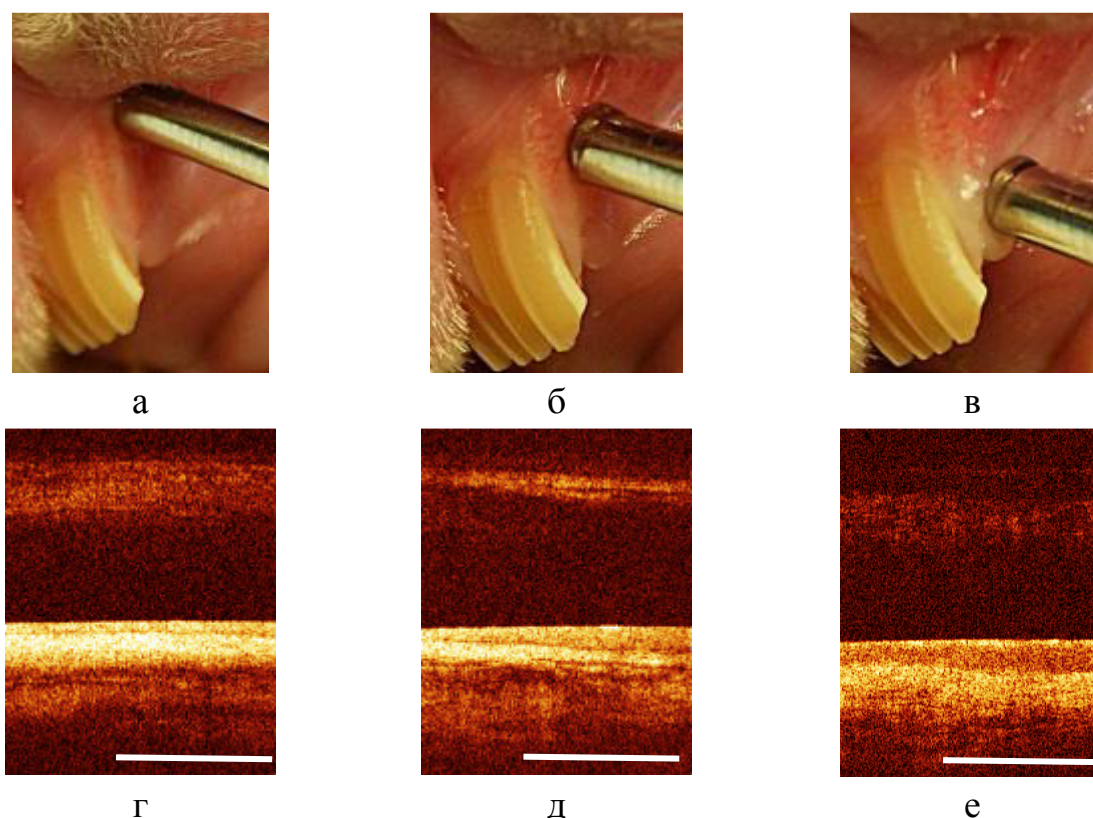


Рис. 15. КП ОКТ изображения десны верхней челюсти кролика слева вблизи резцов. а, г – прикрепленная десна, б, д – граница прикрепленной и свободной десны, в, е – свободная десна. Бар 1 мм.

КП ОКТ изображения прикрепленной десны (рис. 15, а, г) в ко-поляризации имеет четкую слоистую структуру (3 слоя – эпителий, подслизистый слой, мышца с участками соединительной ткани). В кросс-поляризации подслизистый слой характеризуется равномерным сигналом средней интенсивности. КП ОКТ изображения границы между прикрепленной и свободной десной (рис. 15, б, д) имеет схожие визуальные характеристики с КП ОКТ изображениями прикрепленной десны. На ко-поляризации КП ОКТ изображений свободной десны (рис. 15, в, е) хорошо визуализируются 2 слоя – эпителий с низким уровнем сигнала (верхний) и подслизистый слой с более высоким уровнем сигнала (нижний), что соответствует выявленным морфологическим особенностям данного отдела десны. На поверхности эпителия отмечается яркая полоса, соответствующая роговому слою, который более выражен в свободной десне. Подслизистый слой характеризуется равномерный сигнал низкой или средней интенсивности. Известно, что уровень интенсивности сигнала в кросс-поляризации зависит от состояния и упаковки коллагеновых волокон [19]. На основе анализа сигнала кросс-поляризаций КП ОКТ изображений прикрепленной и свободной десны можно заключить, что в прикрепленной коллагеновые волокна упакованы плотно (сигнал высокой интенсивности), в то время как в свободной десне они упакованы более рыхло (сигнал низкой или средней интенсивности).

Подробное описание визуальных характеристик КП ОКТ изображений десны представлены в Таблице 2.

Таблица 2.

Характеристики КП ОКТ изображений при исследовании десны верхней челюсти кролика вблизи резцов.

Точка	Ко-поляризация			Обратная поляризация		
	Прикрепленная десна	Граница	Свободная десна	Прикрепленная десна	Граница	Свободная десна
Слои	четкая слоистая	четкая слоистая	четкая слоистая	2 слоя	2 слоя	слабо или хорошо

	структура (3 слоя)	структура (3 слоя)	структура (2 слоя)			различимая граница между слоями
Эпителий	тонкий	толще, чем в прикрепленной десне	толстый, с яркой полосой на поверхности	тонкий, сигнал слабый	толще, чем в прикрепленной десне, сигнал слабый	толстый, с яркой полосой на поверхности
Подслизистый слой	высокий уровень сигнала	высокий уровень сигнала, в виде яркой полосы	сигнал средней интенсивности, сравнимый по глубине с толщиной эпителия	равномерный сигнал средней интенсивности	равномерный сигнал высокой интенсивности	равномерный сигнал низкой или средней интенсивности (в зависимости от степени прижатия)
Мышца	визуализируется	визуализируется	не визуализируется	не визуализируется	не визуализируется	не визуализируется
Глубина сигнала	на всю кополяризацию	на всю кополяризацию	на всю кополяризацию	на половину кополяризации	на половину кополяризации	на треть кополяризации

Таким образом, проведенное параллельное морфологическое и КП ОКТ исследование продемонстрировали особенности строения здоровой десны верхней челюсти кроликов. Показано, что степень ороговения эпителия меньше у прикрепленной десны, однако толщина подслизистого слоя больше у свободной, поэтому данная область является более оптимальной для нанесения лазерных колонок и изучения процессов регенерации ткани.

3.2. Исследование степени повреждения ткани десны экспериментальных животных после лазерного воздействия в зависимости от дозы облучения

ферментов)

При оценке размеров зон лазерных повреждений было установлено, что их размеры растут с увеличением дозы облучения, т.е. чем больше была доза облучения, тем на большую глубину повреждается подслизистый слой (табл. 3). При дозе облучения 1.3 кДж/см² зона поражения затрагивала 1,5 % от общей толщины подслизистого слоя, которая составляла в среднем 1.95±0.03 мм. При наибольшей дозе облучения 4.2 кДж/см² глубина колонки составляла 82 % от толщины подслизистого слоя.

Таблица 3.

Размеры зон повреждения в зависимости от дозы облучения (n=10). В скобках указан % от общей толщины слоя.

Толщина подслизистого слоя составила в среднем 1.95±0.03 мм.

Доза облучения, кДж/см ²	Глубина колонки, мм	Ширина колонки, мм	Глубина колонки в подслизистом слое, мм
1.3	0.27±0.02	0.14±0.03	0.03±0.01 (1.5%)
1.9	0.68±0.03	0.30±0.01	0.54±0.05 (28%)
2.5	1.60±0.05	0.60±0.4	1.40±0.06 (72%)
4.2	1.80±0.03	0.60±0.05	1.60±0.03 (82%)

Для оценки морфологических изменений в области лазерных колонок непосредственно после лазерного воздействия были проанализированы препараты, окрашенные ГЭ и ПСК.

В месте воздействия при дозе облучения 1.3 кДж/см² отмечалось разрушение эпителиального пласта, в собственной пластинке слизистой оболочки – изменение сродства коллагеновых волокон к основным (щелочным) красителям, что свидетельствует о нарушении их структуры, дезориентации, разволокнении, фрагментации, набухании и коагуляции коллагеновых волокон (рис. 18, б). На ПСК препарате было заметно снижение интенсивности красного свечения коллагеновых волокон, особенно в центре колонки, однако на периферии некоторые волокна сохраняли

поляризационные свойства, по-видимому, из-за неполного разрушения их структуры при данном режиме (рис. 18, в).

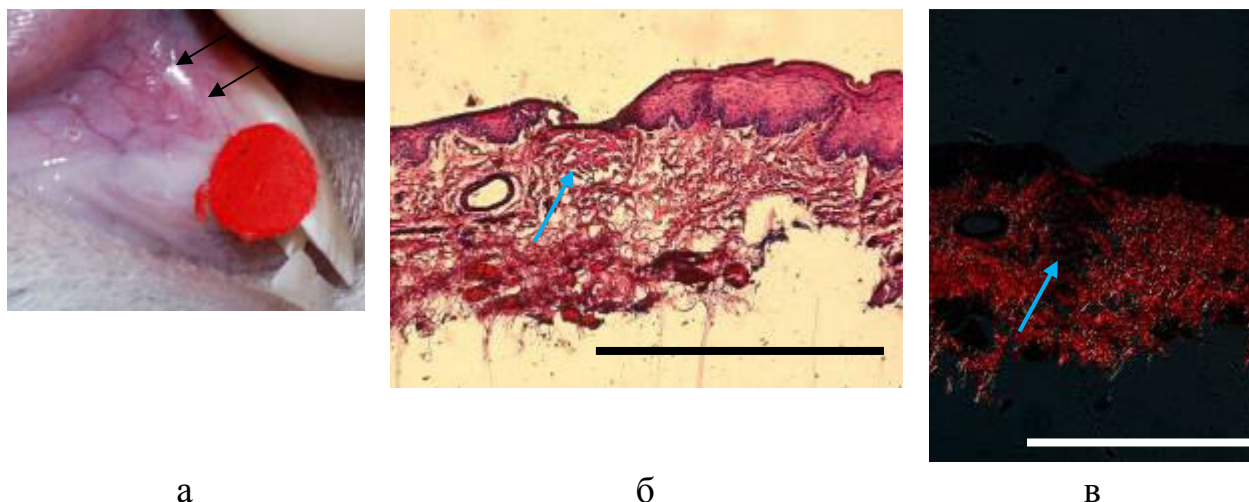


Рис. 18. Режим ЛФ с дозой облучения 1.3 кДж/см^2 . а – область нанесения колонок; б – гистологический препарат, окрашенный ГЭ; в – гистологический препарат, окрашенный ПСК. Стрелками и области лазерных колонок: при окраске ГЭ – область с разрушенным эпителием и коагуляцией соединительной ткани; при окраске ПСК – область с отсутствием сигнала (красного свечения, т.е. черная область) от коллагеновых волокон. Бар на 0.5мм.

Таким образом, облучение с дозой 1.3 кДж/см^2 приводит к повреждению как эпителия, так и соединительной ткани, поэтому данный режим может быть применен для ЛФ слизистой оболочки полости рта. Однако анализ поляризационных свойств коллагеновых волокон выявил неполное разрушение их структуры, что впоследствии может оказать влияние на эффективность лазерной обработки.

В зоне лазерного воздействия с дозой 1.9 кДж/см^2 наблюдалась коагуляция эпителиального пласта, в подлежащей соединительной ткани – набухание и коагуляция коллагеновых волокон, изменение сродства коллагеновых волокон к основным (щелочным) красителям. Волокна соединительной ткани в окружающей колонку зоне были разрежены (рис. 19, б). На ПСК препарате при данном режиме также не было отмечено полной потери коллагеновыми волокнами поляризационных свойств – красное

свечение в поляризационном свете сохранялось, однако четко обнаруживалась зона со значительным его снижением (рис. 19, в).

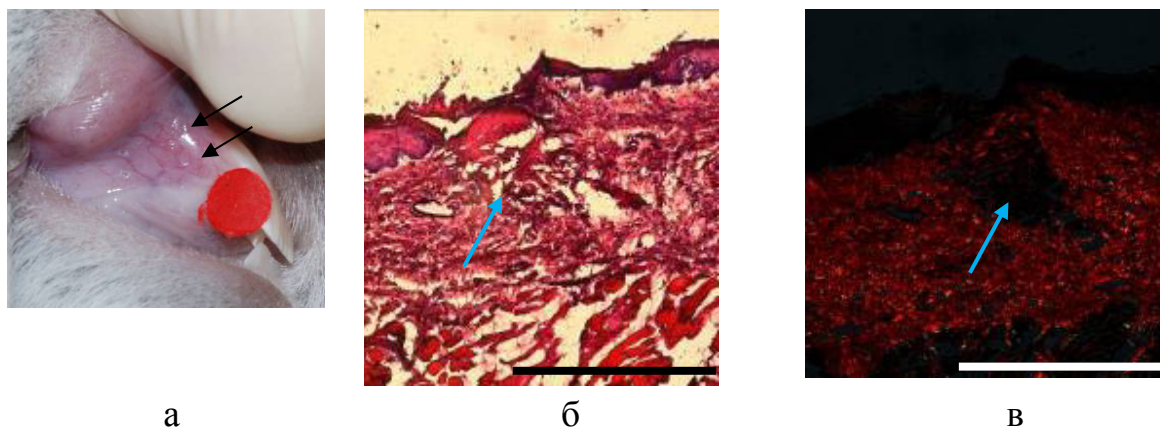
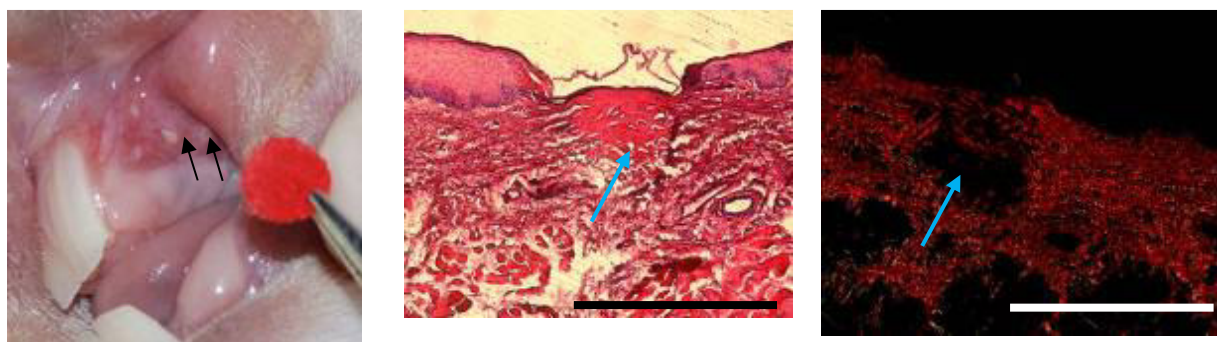


Рис. 19. Режим ЛФ с дозой облучения 1.9 кДж/см². а – область нанесения колонок; б – гистологический препарат, окрашенный ГЭ; в – гистологический препарат, окрашенный ПСК. Стрелками обозначены области лазерных колонок: при окраске ГЭ – область с разрушенным эпителием и коагуляцией соединительной ткани; при окраске ПСК – область с отсутствием сигнала (красного свечения, т.е. черная область). Бар 0.5мм.

Таким образом, при дозе 1.9 кДж/см² также наблюдается разрушение эпителия и соединительной ткани, однако по сравнению с дозой 1.3 кДж/см² данный режим приводит к полному разрушению структуры коллагеновых волокон.

При облучении с дозой 2.5 кДж/см² наблюдались разрушение и коагуляция эпителия; изменение сродства коллагеновых волокон к основным (щелочным) красителям за счет денатурации и коагуляции белков (рис. 20, б). На ПСК препарате при данном режиме отмечалось полная потеря коллагеновыми волокнами поляризационных свойств – красное свечение в поляризационном свете практически отсутствовало (рис. 20, в).



а б в

Рис. 20. Режим ЛФ с дозой облучения 2.5 кДж/см^2 . а – область нанесения колонок; б – гистологический препарат, окрашенный ГЭ; в – гистологический препарат, окрашенный ПСК. Стрелками и обозначены области лазерных колонок: при окраске ГЭ – область с разрушенным эпителием и коагуляцией соединительной ткани; при окраске ПСК – область с отсутствием сигнала (черная область). Бар на 0.5мм.

Таким образом, воздействие с дозой 2.5 кДж/см^2 приводит к полной дезорганизации и коагуляции коллагеновых волокон, т.е. такая доза облучения может обеспечить достаточное повреждение соединительной ткани, стимулирующее дальнейшее ремоделирование коллагена.

В месте лазерного воздействия с дозой 4.2 кДж/см^2 отмечались разрушение и коагуляция эпителия, а также гомогенизация коллагеновых волокон, выраженные изменения сродства коллагеновых волокон к основным (щелочным) красителям за счет денатурации и коагуляции белков (рис. 21, б). На препарате, окрашенном ПСК, наблюдается снижение интенсивности красного свечения (рис. 21, в). Однако по сравнению с дозами 1.9 кДж/см^2 и 2.5 кДж/см^2 данный режим повреждает ткань на большую глубину, что может привести к увеличению времени процесса регенерации.

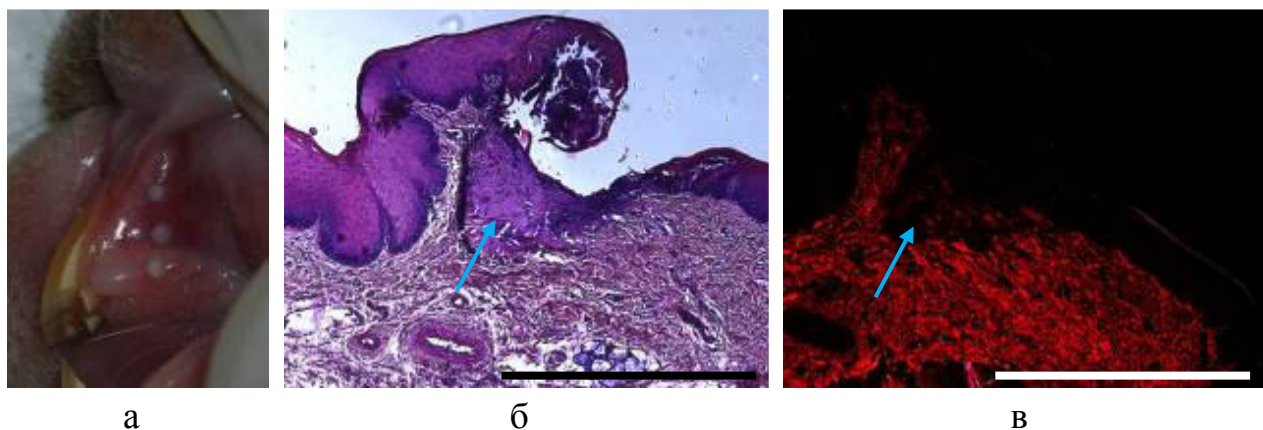


Рис. 21. Режим ЛФ с дозой 4.2 кДж/см^2 . а – область нанесения колонок; б – гистологический препарат, окрашенный ГЭ; в – гистологический препарат, окрашенный ПСК. Стрелками обозначены области лазерных колонок: при окраске ГЭ – область с разрушенным эпителием и коагуляцией соединительной ткани; при окраске ПСК – область с отсутствием сигнала

(красного свечения, т.е. черная область). Бар 0.5мм.

Данный этап работы показал, что сразу после повреждения при всех дозах облучения обнаруживались деструкция эпителия, полная дезактивация ферментов и признаки коагуляции коллагена, которые нарастали с повышением дозы от 1.3 кДж/см² до 4.2 кДж/см². Потеря коллагеном поляризационных свойств также нарастала с повышением дозы лазерного облучения.

ЛФ с дозами облучения 1.3 кДж/см², 1.9 кДж/см², 2.5 кДж/см² и 4.2 кДж/см² повреждает соединительную ткань десны, что впоследствии может привести к стимулированию восстановления коллагеновых волокон после воздействия. Однако в дальнейшем облучение с дозой 4.2 кДж/см² не была использована из-за сильной боли, которое испытывало животное при нанесении колонок, вероятно, за счет повреждения подслизистого слоя практически на всю его толщину, что может привести к увеличению периода заживления. Важно отметить, что при всех дозах облучения в окружающей зону воздействия области не было выявлено морфологических изменений.

Таким образом, воздействие ЛФ на десну с дозами облучения 1.3 кДж/см², 1.9 кДж/см² и 2.5 кДж/см² может рассматриваться как мало повреждающее воздействие, которое приводит к разрушению эпителия и полной коагуляции соединительной ткани в зоне микротермического воздействия и отсутствию поражения окружающих тканей.

3.3. Исследование динамики заживления десны животных и человека после различных доз лазерного облучения

3.3.1. Заживление десны кроликов после ЛФ

Известно, что заживление ран проходит через последовательные и перекрывающиеся фазы: воспаления, пролиферации и регенерации (ремоделирования) [69].

На данном этапе работы детально были изучены процессы заживления десны, происходящие после ЛФ с дозами облучения 1.3 кДж/см², 1.9 кДж/см²

и 2.5 кДж/см^2 . Как описано в предыдущем разделе, непосредственно после ЛФ при всех дозах облучения в зоне лазерного воздействия эпителий был разрушен, а соединительная ткань коагулирована (рис. 22, а). На ПСК препарате отмечалось практически полная потеря коллагеновыми волокнами поляризационных свойств – красное свечение в поляризационном свете отсутствовало (рис. 22, в).

Гистологически заживление десны кроликов после ЛФ имело общие черты для всех доз облучения. Далее в качестве примера приведены изображения для дозы облучения 2.5 кДж/см^2 .

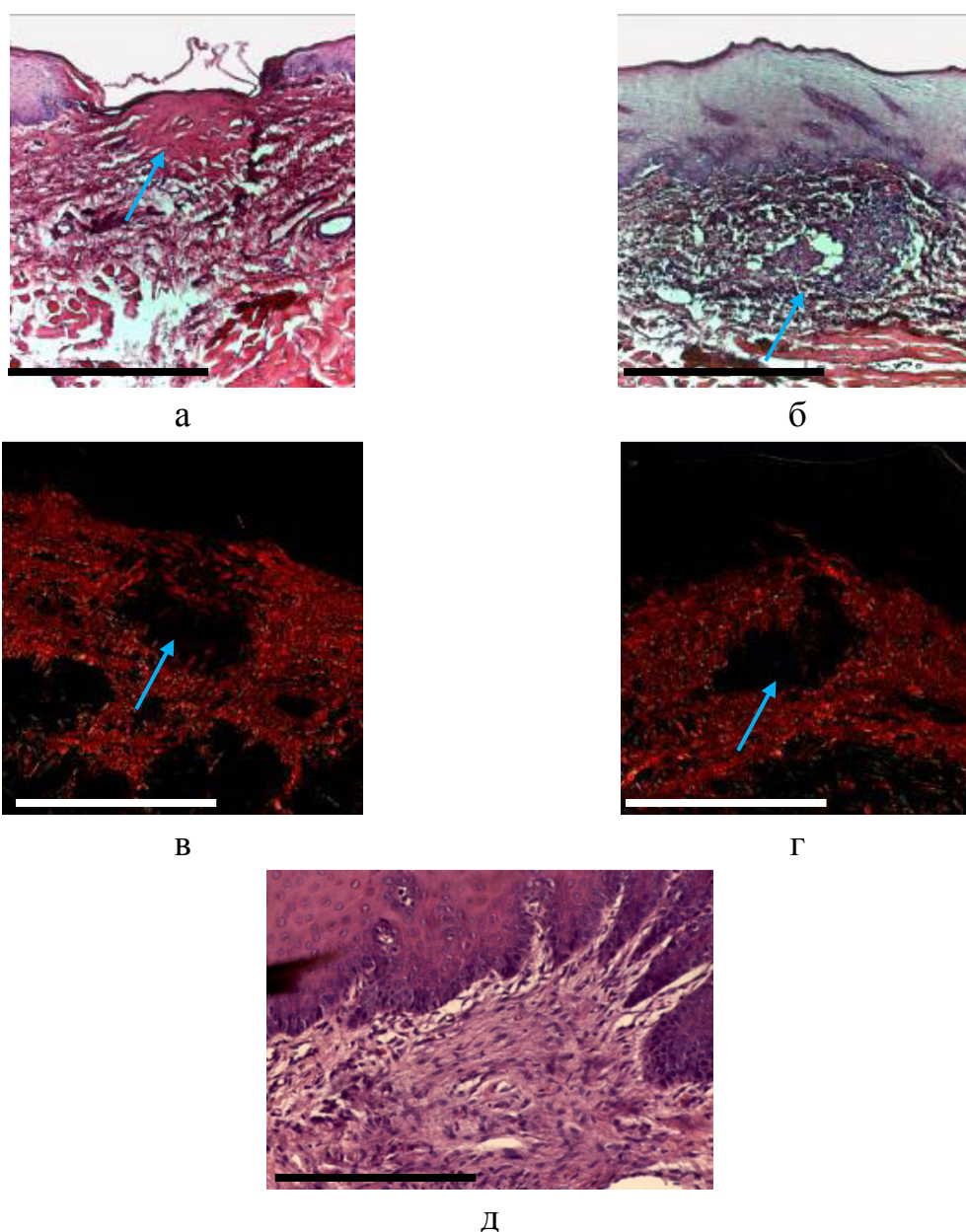


Рис. 22. Гистологические препараты десны верхней челюсти кролика непосредственно после ЛФ (повреждение и фаза воспаления) (а, в) и через

5 суток (б, г, д) после ЛФ (фаза воспаления и пролиферации - – максимум воспалительной клеточной инфильтрации, активация фибробластов и образование тонкостенных кровеносных сосудов) при дозе облучения 2.5 кДж/см². Окраска ГЭ (а, б, д); окраска ПСК (в, г). Бар на гистологических препаратах 0.5мм. Стрелками обозначены области лазерных колонок.

На 5 сутки после воздействия в эпителии отмечалось наличие базальноклеточной активности, что говорит о процессе образования нового эпителия (рис. 22, б). На 5 сутки после ЛФ наблюдался процесс формирования молодого эпителия, который, вероятно, еще не полностью завершен, отчетливые признаки формирования молодой соединительной ткани – большое количество хаотично расположенных фибробластов, тонкие коллагеновые волокна, расположенные непосредственно под эпителием, единичные тонкостенные сосуды (рис. 22, д). Однако все еще сохранялся выраженный воспалительный инфильтрат, как в зоне лазерного повреждения, так и вокруг нее (рис. 22, б). Отметим, что первые признаки восстановления эпителия определялись уже на 1-2 сутки после лазерной обработки. Кроме того, при дозе облучения 1.3 кДж/см² повышенная активность фибробластов, свидетельствующая о начале восстановления соединительной ткани, обнаруживалась уже на 3 сутки после воздействия.

На 12 сутки наблюдался молодой сформированный эпителий с признаками акантоза, папилломатоза, пара - и гиперкератоза и с сохраняющейся гиперактивностью клеток базального слоя (рис. 23, а). При лазерном повреждении десны в соединительной ткани на 12 сутки сохранялись зоны коагуляции, при этом выявлялся участок формирования молодой соединительной ткани с большим количеством фибробластов и тонкостенными сосудами, сохранялся воспалительный инфильтрат. На ПСК препарате в зоне воздействия наблюдалось снижение интенсивности красного свечения и разреженность коллагеновых волокон, что соответствовало формированию молодой соединительной ткани. Но в тоже время все еще сохранялись зоны с полным отсутствием красно-желтого

свечения, что позволяет сделать заключение о неполном восстановлении соединительной ткани в зоне воздействия (рис. 23, в).

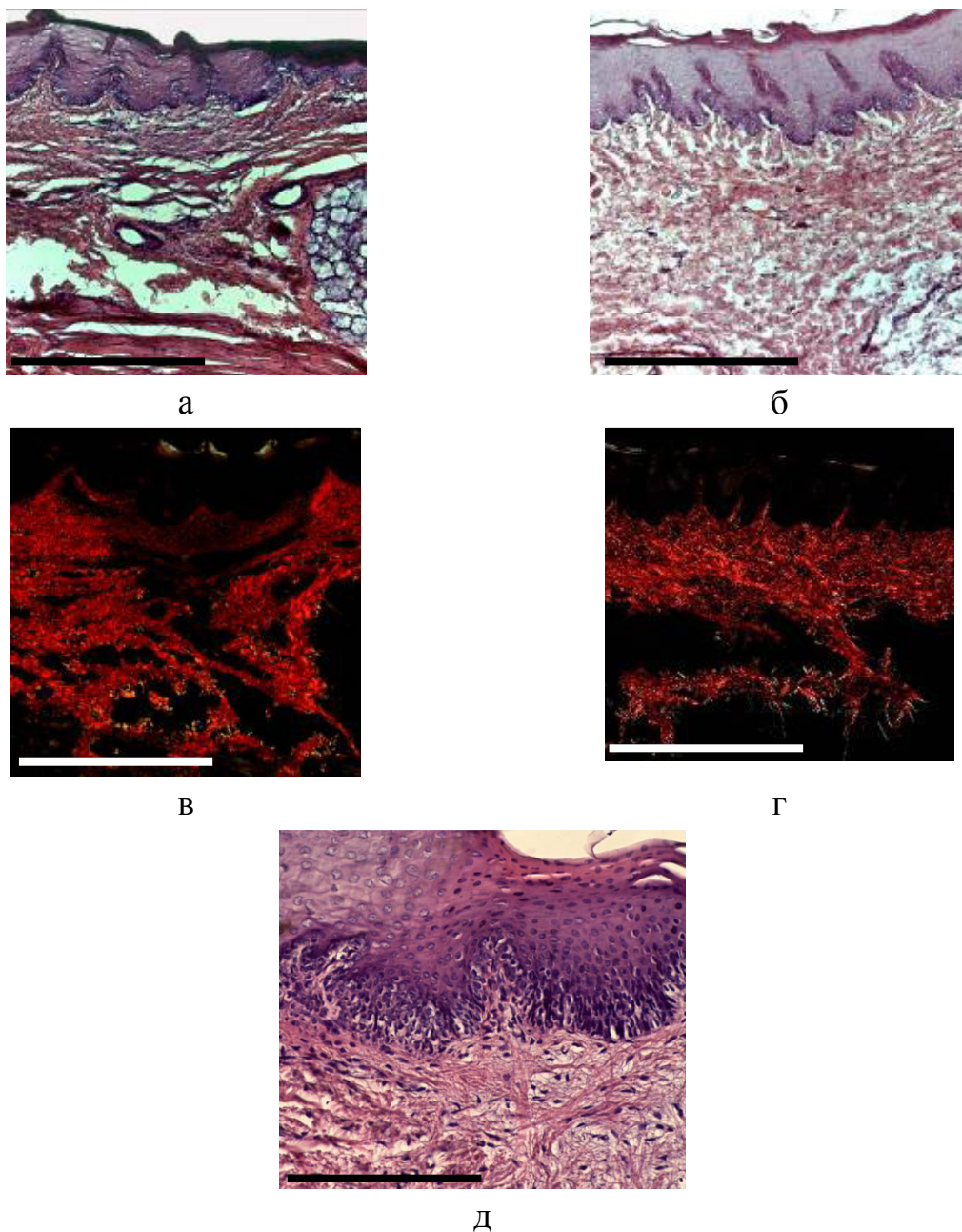


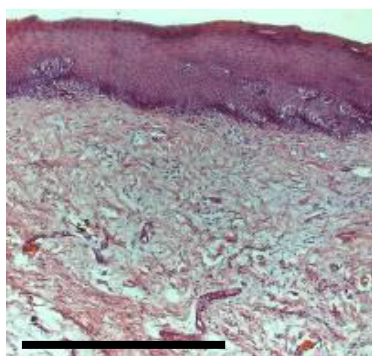
Рис. 23. Гистологические препараты десны верхней челюсти кролика через 12 суток (фаза пролиферации - - новый эпителий и молодые коллагеновые волокна (наличие сигнала низкой интенсивности на препаратах ПСК)) (а, в, д) и через 20 суток после ЛФ (фаза регенерации - - коллаген полностью сформирован (восстановление поляризационных свойств коллагеновых волокон на препаратах окрашенных ПСК, т.е. отсутствие черных зон в области воздействия)) (б, г) при дозе облучения 2.5 кДж/см². Окраска ГЭ (а, б, д), окраска ПСК (в, г). Бар 0.5мм.

На 12 сутки после можно говорить о полном восстановлении эпителия, однако в соединительной ткани процесс восстановления не завершен: сохраняется коагуляция и слабо выраженный воспалительный инфильтрат. Известно, что воспаление при заживлении ран сохраняется вплоть до 25 суток. Отметим, что темп восстановления ткани при разных режимах облучения отличался.

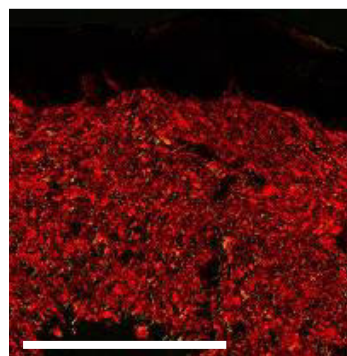
На 20 сутки после воздействия на гистологических препаратах обнаруживался новый эпителий обычной толщины с выраженными признаками паракератоза; изменений в структуре соединительной ткани не наблюдалось (рис. 23, б). На ПСК препарате зона воздействия не идентифицировалась (рис. 23, г).

По анализу полученных данных можно сделать вывод о полном восстановлении структуры ткани в зоне воздействия на 20 сутки, однако с признаками несовершенного ороговения в эпителии (паракератоз), которые могут рассматриваться и как нормальное физиологическое состояние.

К 90 суткам происходило полное восстановление структуры ткани, при этом признаки несовершенного ороговения эпителия полностью исчезли (рис. 24).



а



б

Рис. 24. Гистологические препараты десны верхней челюсти кролика через 90 суток после ЛФ при дозе облучения 2.5 кДж/см^2 (фаза регенерации - коллаген полностью сформирован (восстановление поляризационных свойств коллагеновых волокон на препаратах окрашенных ПСК, т.е. отсутствие черных зон в области воздействия)). Окраска ГЭ (а), окраска ПСК (б). Бар на 0,5мм.

Исследование показало, что сроки начала фаз заживления и период полного восстановления ткани для разных доз облучения отличались – чем больше доза, тем позже запускаются и заканчиваются процессы восстановления ткани после ЛФ (табл. 4).

Таблица 4.

Сроки заживления десны кроликов после ЛФ в зависимости от дозы облучения

	1.3 кДж/см²	1.9 кДж/см²	2.5 кДж/см²
Воспалительная фаза	1 сутки	1 сутки	1 сутки
Пролиферативная фаза			
начало процесса реэпителизации	1 сутки	1-2 суток	2 суток
начало регенерации соединительной ткани	3 суток	4 суток	5 суток
Регенерационная фаза			
окончание процесса реэпителизации	7 суток	<12 суток	12 суток
восстановление соединительной ткани	<20 суток	<20 суток	≤20 суток

Таким образом, показано, что заживление десны кроликов после ЛФ проходит классические фазы заживления ран. Начало и окончание фаз отличается для исследованных доз облучения. Первые признаки восстановления эпителия определялись на 1-2 сутки после лазерной обработки при всех дозах облучения. Повышенная активность фибробластов, свидетельствующая о начале восстановления соединительной ткани, обнаруживалась на 3, 4 и 5 день при дозах 1,3 кДж/см², 1,9 кДж/см² и 2,5 кДж/см² соответственно. Полное восстановление структуры ткани происходило к 20 сутки после обработки, однако, наблюдались признаки несовершенного ороговения эпителия (паракератоз), которые полностью исчезали к 90 суткам.

3.3.2. Заживление десны человека после ЛФ

Для изучения процесса восстановления десны человека после ЛФ была использована доза облучения 2,5 кДж/см², поскольку при анализе повреждения десны кролика было выяснено, что глубина повреждения ткани при таком облучении максимальна. Внешний вид слизистой оболочки полости рта человека после ЛФ показан на рис. 25.

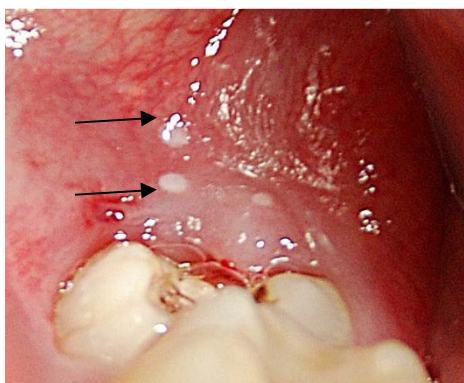


Рис. 25. Внешний вид нижней челюсти человека после ЛФ. Стрелками отмечены области воздействия (лазерные колонки).

Процессы восстановления десны после ЛФ изучались с целью установления степени повреждения эпителия и соединительной ткани на десне различного строения, а также динамики их восстановления.

Лазерные колонки были нанесены на сильно и слабо ороговевающим эпителием десны нижней челюсти. Размер колонки на десне с сильно ороговевающим эпителием составил 1.2 мм в глубину и 0,7 мм в ширину. В случае слабо ороговения размер колонки составил 0.6 x 0.7 мм, при этом глубина повреждения стромы соответствовала 0.4-0.5 мм

При анализе гистологических препаратов была обнаружена полная дезактивация ферментов на препаратах, окрашенных нитро-СТ (рис. 26, а, б), и полная деструкция эпителия и коагуляция соединительной ткани на препаратах, окрашенных ГЭ (рис. 26, в).

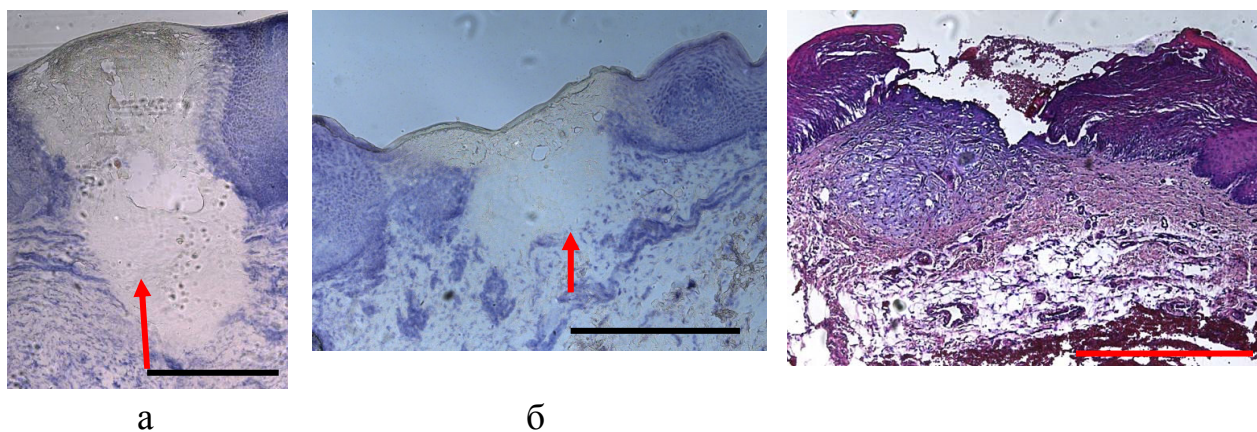


Рис. 26. Гистологические препараты десны человека непосредственно после ЛФ при дозе облучения 2.5 кДж/см². а, б – окраска нитро-СТ, в – окраска ГЭ. Бар 0.5мм. Стрелками отмечена зона дезактивации ферментов (область лазерной колонки)

Для понимания механизмов лазерного воздействия важным является не только информация о процессах повреждения, а также о процессах регенерации ткани после ЛФ.

Анализ гистологических данных показал, что на 3 сутки после ЛФ колонка была покрыта новым молодым эпителием, что подтверждалось малым размером эпителиальных клеток, расположенных с высокой плотностью, а также гиперактивностью базальных слоев. При этом еще сохранялась нежизнеспособность соединительнотканной стромы (рис. 27).

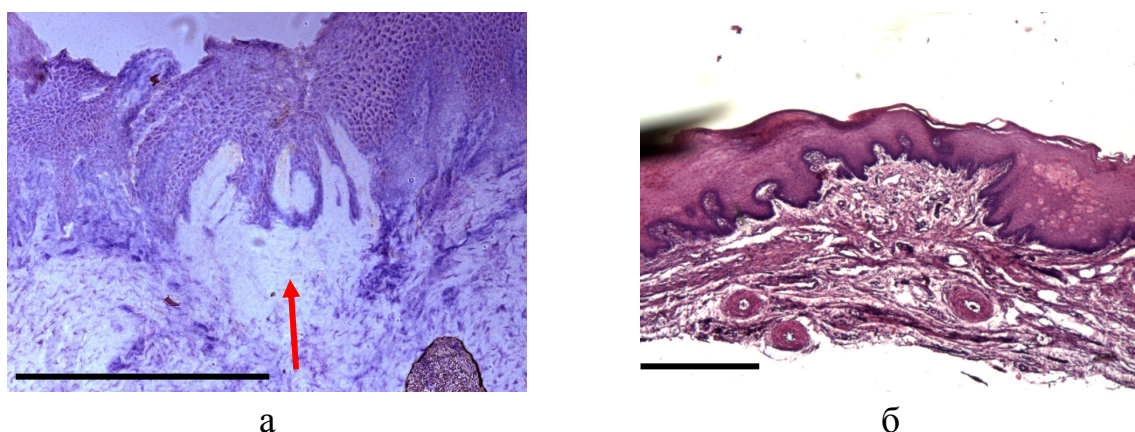


Рис. 27. Гистологические препараты десны человека через 3 суток после ЛФ при дозе облучения 2.5 кДж/см². а – окраска нитро-СТ, в – окраска ГЭ. Бар 0,5мм. Стрелкой обозначена область колонки.

При анализе данных через 20 суток после ЛФ было выявлено, что на препаратах, окрашенных ГЭ наблюдалась полностью сформированный

эпителий и восстановленная соединительная ткань без признаков рубцевания, что подтверждалось высокой интенсивностью красного свечения на препаратах, окрашенных ПСК (рис. 28). Отметим, что в данном случае можно было наблюдать заметный противовоспалительный эффект после ЛФ.

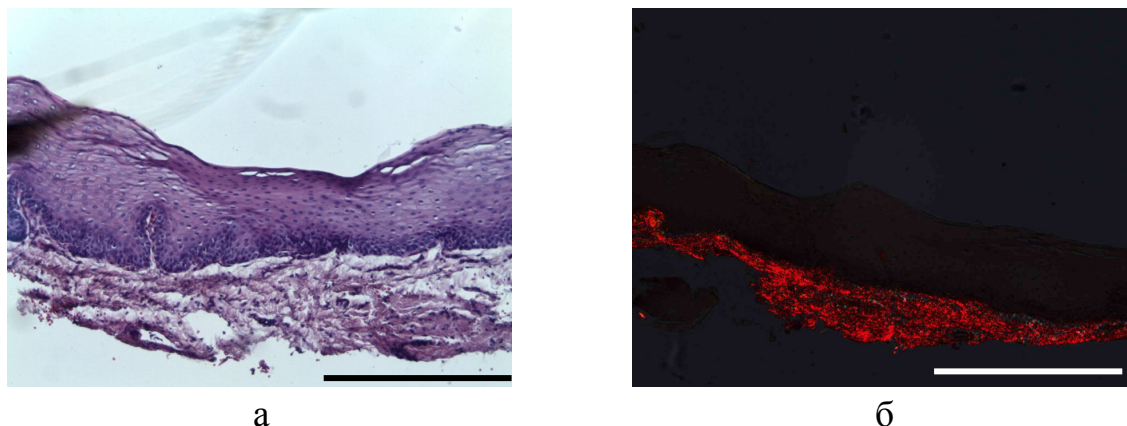


Рис. 28. Гистологические препараты десны человека через 20 суток после ЛФ при дозе облучения 2.5 кДж/см². а – окраска ГЭ, в – окраска ПСК. Бар 0,5мм.

На гистологических препаратах, окрашенных ГЭ на 90 сутки после ЛФ над областью колонки наблюдался полностью сформированный эпителий (рис. 29, а). В строме признаков рубцовой ткани обнаружено не было. При этом на препаратах, окрашенных ПСК, интенсивность красного свечения в области колонки соответствовала слизистой оболочке до воздействия (рис. 29, б). В данном случае можно говорить о полном восстановлении коллагеновых волокон в зоне воздействия.

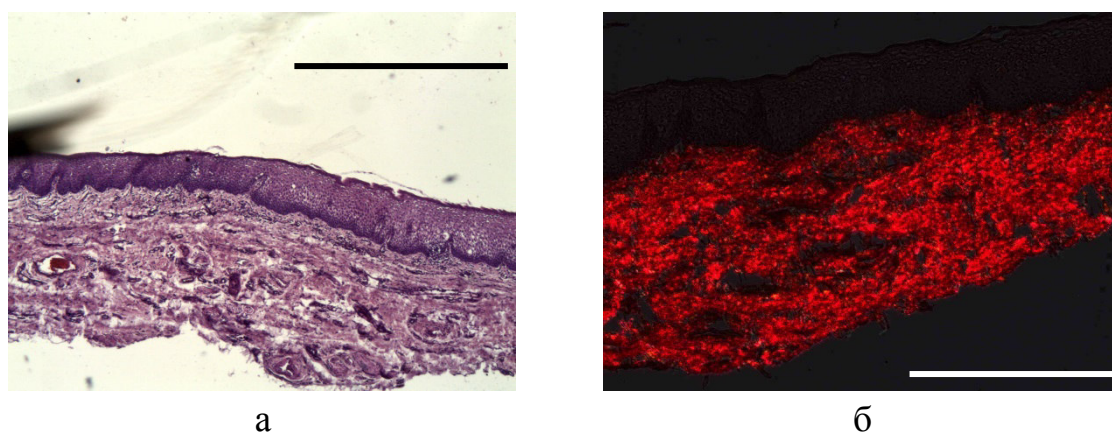


Рис. 29. Гистологические препараты десны человека через 90 суток после ЛФ при дозе облучения 2.5 кДж/см². а – окраска ГЭ, в – окраска

ПСК. Бар 0,5мм.

Данный этап работы выявил темпы заживления десны человека после ЛФ. Показано, что на 3 сутки после ЛФ восстановления эпителия было полностью завершено. В эпителии были обнаружены гиперактивность базальных слоев эпителия и высокая плотностью мелких (молодых) эпителиальных клеток. На 20 сутки после ЛФ эпителий был полностью сформирован, а соединительная ткань восстановлена, однако в ней еще сохранялась отек и повышенная васкуляризация. На 90 сутки после воздействия не было обнаружено развития нежелательных побочных эффектов в зоне локального лазерного повреждения и окружающих тканях (рубцевания, эритема, нарушения пигментации).

Таким образом, процессы восстановления десны у кролика и у человека после ЛФ соответствовали классическим фазам заживления ран и заканчивались к 20-м суткам после воздействия. Важно, что ЛФ не сопровождалось развитием побочных эффектов в зоне локального повреждения и в окружающих тканях.

3.4. Разработка методологии применения кросс-поляризационной оптической когерентной томографии для мониторинга восстановления ткани десны животных и человека после лазерного фототермолиза

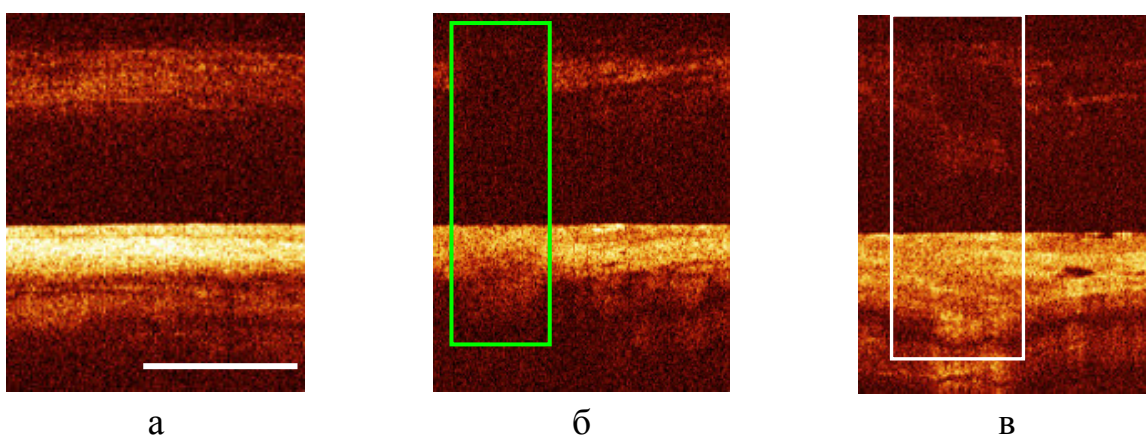
На данном этапе работы методом КП ОКТ прижизненно визуализировались процессы заживления и регенерации слизистой оболочки полости рта кроликов после лазерной обработки. Как известно, КП ОКТ способна демонстрировать как рассеивающие, так и различные поляризационные свойства тканей – двулучепреломление и кросс-рассеяние. Данный метод прижизненно исследует не только микроструктурные изменения тканей, но и дает представление об изменении биохимизма и структуры коллагена на основе оценки его поляризационных характеристик. На КП ОКТ изображениях в ко-поляризации оценивают наличие контрастных тканевых слоев, а на изображениях в кросс-поляризации

оценивают наличие и интенсивность сигнала от коллагеновых волокон, что особенно важно при анализе процессов, происходящих после лазерного воздействия. Однако для объективной оценки КП ОКТ изображений должна также применяться количественная обработка.

3.4.1. Изучение процесса заживления десны кролика после ЛФ методом КП ОКТ

Напомним, что КП ОКТ изображения десны в ко-поляризации имеет четкую слоистую структуру, в кросс-поляризации подслизистый слой характеризуется равномерным сигналом средней интенсивности (рис. 31, а).

Непосредственно после воздействия на КП ОКТ изображениях десны кролика отчетливо выявлялись зоны колонок, представляющие собой область с нарушенной слоистой структурой в ко-поляризации, что соответствует зоне разрушения и коагуляции эпителия и стромы на гистологических препаратах, и отсутствием сигнала в кросс-поляризации, что соотносится с потерей коллагеном поляризационных свойств на гистологических препаратах, окрашенных ПСК (рис. 30, б). во всех случаях на КП ОКТ изображении по обе стороны от области воздействия наблюдались сохраненные области жизнеспособного эпителия и стромы, которые должны обеспечивать быструю регенерацию ткани.



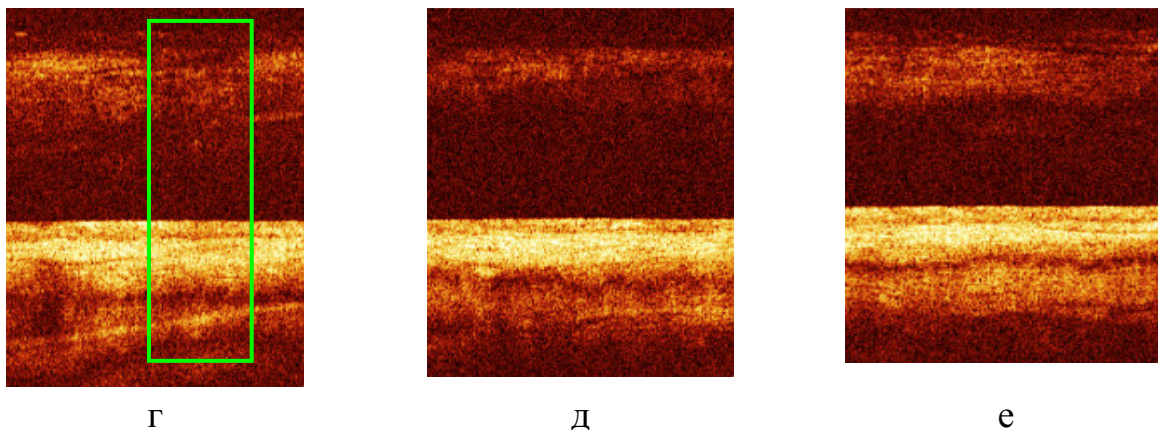


Рис. 30. Динамика изменения КП ОКТ изображений десны кролика при заживлении лазерных колонок после ЛФ при дозе облучения 2.5 кДж/см². а – контроль, б – непосредственно после воздействия, в – через 5 суток, г – через 12 суток, д – через 20 суток, е – через 90 суток. Прямоугольниками обозначена область колонки. Здесь и далее бар для ОКТ изображений 1 мм

На 5 сутки после ЛФ на КП ОКТ изображениях прослеживалась постепенное заживление области, подвергнутой воздействию (рис. 30, в). В ко-поляризации отмечалось начало восстановления слоистой структуры, что полностью соотносится с данными гистологического анализа. В кросс-поляризации в области колонки обнаруживался небольшой сигнал от стромы, что также свидетельствует об активных процессах восстановления коллагеновых волокон, выявленных на гистологических препаратах. Однако в кросс-поляризации все еще сохранялась зона с отсутствием сигнала от коллагена, что говорит о сохранении, наряду с восстановлением ткани, области коагуляции в строме (рис. 30, в).

На КП ОКТ изображении на 12 сутки после ЛФ в ко-поляризации отчетливо была видна слоистая структура (рис. 30, г), что говорит о полном восстановлении эпителия в зоне воздействия, что доказывалось гистологическими данными. В кросс-поляризации зона воздействия идентифицировалась по некоторому ослаблению сигнала от стромы, что связано с еще неполным восстановлением и продолжающимся процессом регенерации соединительной ткани, выявленном на гистологических препаратах (рис. 30, г).

КП ОКТ изображения колонки на 20 сутки демонстрировали отчетливое заживление: в ко-поляризации слоистая структура ткани восстановлена полностью, в кросс-поляризации не наблюдалось зон с ослаблением или отсутствием сигнала (рис. 30, д).

На КП ОКТ изображении отмечалось наличие слоистой структуры и отчетливый сигнал как от эпителия, так и от стромы в ко-поляризации, а также равномерным сигналом в кросс-поляризации (рис. 30, е), т.е. КП ОКТ изображение соответствовало здоровой слизистой оболочке полости рта (рис. 30, а).

Для количественной оценки КП ОКТ изображений выделили 6 групп, для которых рассчитывалось среднее значение стандартного отклонения (СО) ОКТ сигнала в кросс-поляризации по группе (табл. 5).

Таблица 5.

Результаты количественной оценки среднеквадратичного отклонения ОКТ сигнала в кросс-поляризации КП ОКТ изображений

Норма	0 суток	5 суток	12 суток	20 суток	90 суток
6,02±0,12 (n=15)	3,82±0,11 (n=15)	3,88±0,06 (n=15)	5,00±0,15 (n=15)	5,16±0,14 (n=15)	5,86±0,29 (n=15)

Количественный анализ сигнала показал, что к 12 суткам после ЛФ СО ОКТ сигнала в кросс-поляризации возрастает по сравнению со значением непосредственно после воздействия (0 суток), что соответствовало интенсивному восстановлению коллагена, выявленному при гистологическом анализе. СО достигало исходного значения к 90 суткам после ЛФ ($p < 0.05$), что свидетельствовало о восстановлении коллагена в области лазерного повреждения без признаков образования рубца (рис. 31).

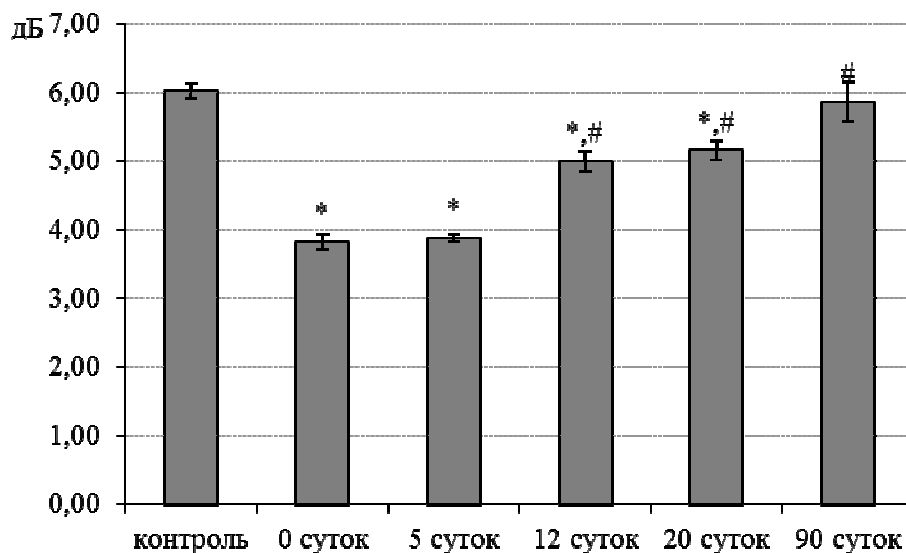
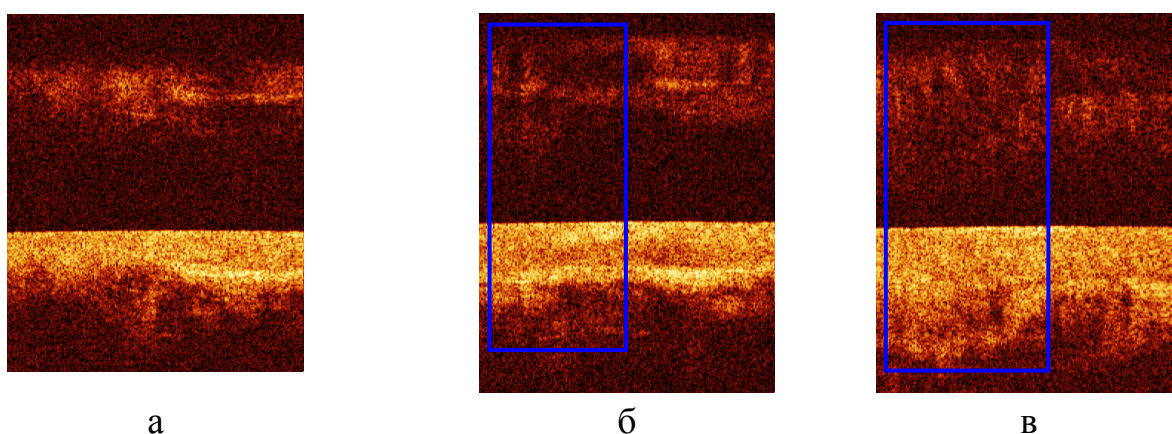


Рис. 31. Средние значения среднеквадратичного отклонения ОКТ сигнала в кросс-поляризации при заживлении лазерных колонок от момента нанесения (0 сутки) до 90 суток. * - статистически значимое различие между контролем и всеми сроками наблюдения после ЛФ, # - статистически значимое различие между 0 сутками и всеми сроками наблюдения после ЛФ

3.4.2. Изучение процесса заживления десны человека после ЛФ методом КП ОКТ

КП ОКТ изображения десны человека до и непосредственно после ЛФ имели сходные черты с изображениями, полученными у кролика (рис. 32, а, б). На КП ОКТ изображении через 3 суток после ЛФ область колонки еще была различима: в кросс-поляризации обнаруживался сигнал от молодого ороговевающего эпителия, но при этом коллагеновые волокна еще не были сформированы (рис. 32, в).



а

б

в

Рис. 32. Динамика изменения КП ОКТ изображений десны человека при заживлении лазерных колонок после ЛФ при дозе облучения 2.5 кДж/см^2 . а – до ЛФ, б – непосредственно после ЛФ, в – через 3 суток. Прямоугольниками отмечена зона лазерной колонки.

Через 5 суток после ЛФ в ко-поляризации были видны признаки эпителизации области колонки, однако коллаген стромы не визуализировался в кросс-поляризации (рис. 33, б); на 12 суток – сигнал от стромы был почти полностью восстановлен (рис. 33, в); на 20 суток – структура была восстановлена полностью, что подтверждается гистологическими данными (рис. 33, г). Стоит отметить, что на 20 суток сохранялись признаки отека (горизонтальная полоса с низкой интенсивностью сигнала в ко-поляризации – красная стрелка на рис. 33, г) и повышенная васкуляризация.

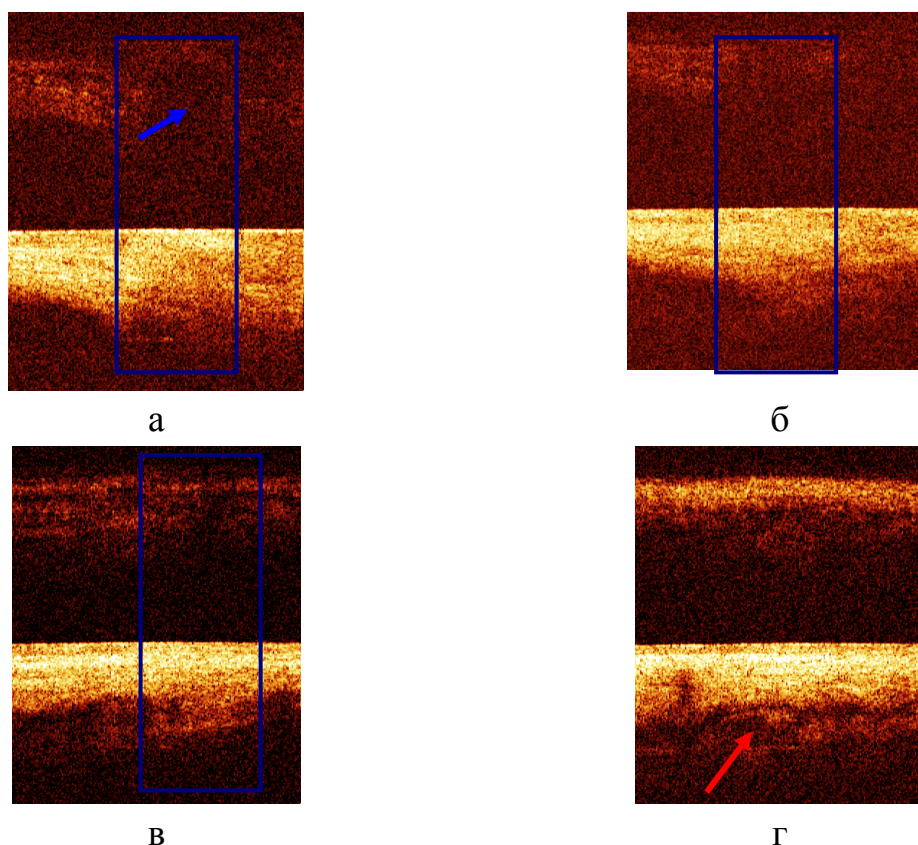


Рис. 33. Динамика изменения КП ОКТ изображений десны человека при заживлении лазерных колонок после ЛФ при дозе облучения 2.5 кДж/см^2 . а – непосредственно после ЛФ, б – через 5 суток, в – через 12 суток, г - через 20 суток. Прямоугольниками отмечена зона лазерной колонки. Красная стрелка (область отека) - горизонтальная полоса с низкой интенсивностью сигнала. Синяя стрелка - дезорганизованный коллаген стромы

Следующий пример также подтверждает приведенные выше визуальные характеристики КП ОКТ изображений: через 3 суток после ЛФ в ко-поляризации были видны признаки эпителизации область колонки, при этом сигнал от коллагеновых волокон стромы был ослаблен (рис. 34, б); на 12 суток – сигнал от стромы был почти полностью восстановлен (рис. 34, в); на 90 суток – структура ткани была восстановлена полностью (рис. 34, г), что подтверждается гистологическими данными.

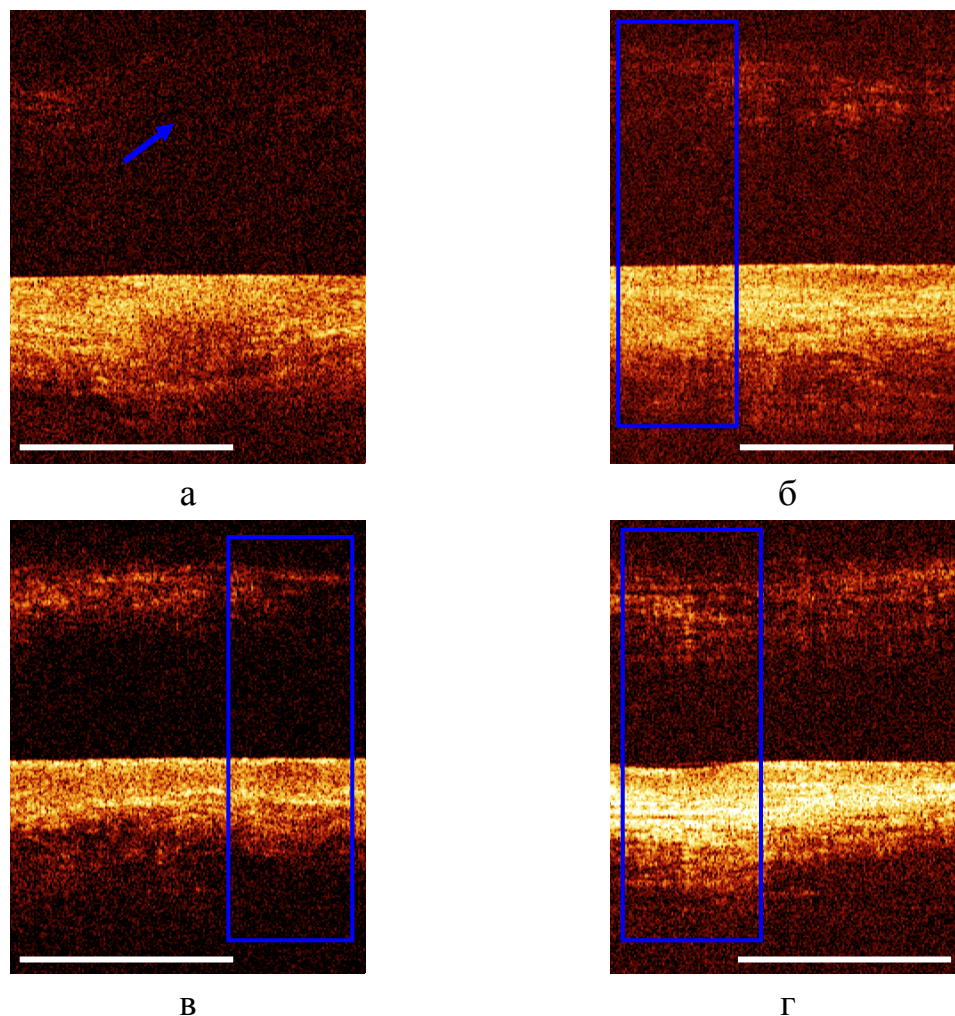


Рис. 34. Динамика изменения КП ОКТ изображений десны человека при заживлении лазерных колонок после ЛФ при дозе облучения 2.5 кДж/см^2 . а – непосредственно после ЛФ, б – через 3 суток, в – через 12 суток, г - через 90 суток. Прямоугольниками обозначена область колонки.

На данном этапе было показано, что КП ОКТ прижизненно отражает наиболее значительные этапы заживления десны кролика и человека после ЛФ, подтвержденные гистологическим анализом.

Таким образом, метод КП ОКТ может быть использован в качестве прижизненного метода контроля регенерации слизистой оболочки полости рта после ЛФ, поскольку данный метод объективно отражает степень лазерного повреждения мягких тканей полости рта и позволяет наблюдать последующие за лазерным воздействием процессы. Критерием эффективного заживления лазерных колонок после ЛФ методом КП ОКТ может служить полное восстановление интенсивности сигнала на кросс-поляризационных изображениях.

3.5. Разработка методологии лазерного фототермолиза для лечения патологических состояний пародонта человека

3.5.1. Определение чувствительности пациентов к различным режимам лазерного фототермолиза

Перед началом оценки возможностей метода ЛФ для лечения воспалительных заболеваний и нарушений пигментации пародонта определялся уровень боли человека в зависимости от режима лазерной обработки.

На рисунке 35 представлена схема нанесения лазерных колонок на десну верхней челюсти.

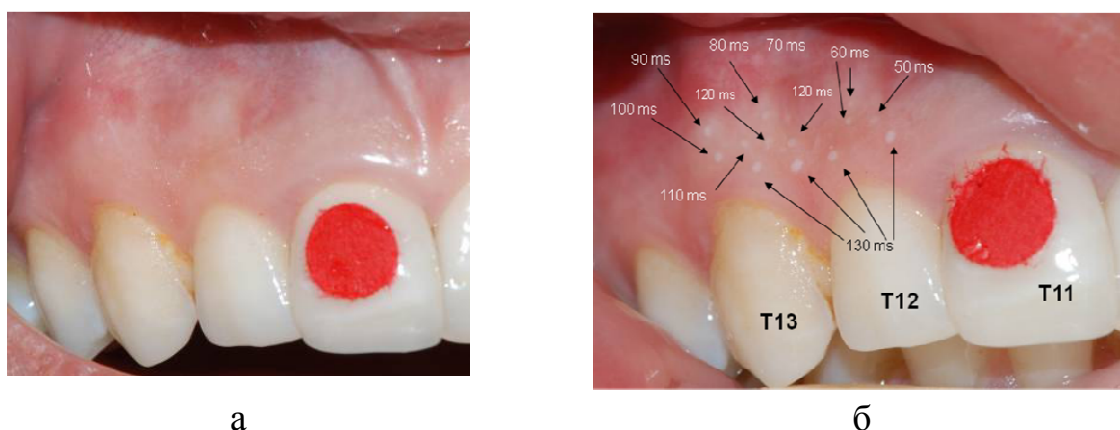


Рис. 35. Десна верхней челюсти. а – до лазерной обработки; б – после лазерной обработки.

У добровольцев в зависимости от длительности лазерного импульса (дозы облучения) фиксировался различный уровень боли при нанесении колонок (табл. 6).

Таблица 6.

Уровень боли у человека в зависимости от длительности лазерного импульса

Длительность лазерного импульса (мс)	50	60	70	80	90	110	120	130
Уровень боли добровольца №1	1a	1a	1б	1б	1б	2a	2a	2б
Уровень боли добровольца №2	1a	1б	1б	1б	1б	2a	2б	-

Отметим, что предельным болевым ощущением, которое можно легко терпеть, являлся уровень 2a (маленький порез/царапанье (порез бумагой)) (в таблицах выделено красным).

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение, что для клинического применения ЛФ могут быть использованы длительности лазерного импульса 80-120 мс (дозы 1.3-1.9 кДж/см²).

3.5.2. Оценка возможности применения лазерного фототермолиза при лечении пародонтита

Для оценки возможности применения ЛФ при лечении хронического генерализованного пародонтита легкой и средней степени тяжести были апробированы режимы однократного воздействия с дозами 1.3 кДж/см² и 1.9 кДж/см². Доза 1.3 кДж/см² использовалась для воздействия на край десны из-за высокой болевой чувствительности данной области к воздействию. Доза 1.9 кДж/см² применялась для обработки от края десны до дна пародонтального кармана. Лазерные колонки наносились по пораженной поверхности равномерно (рис. 36).



Рис. 36. Десна верхней челюсти пациента с пародонтитом после ЛФ. Площадь лазерного поражения 30-40%. Красный круг для визуального контроля степени покраснения десны.

Через 3 месяца после воздействия ЛФ отмечено уменьшение глубины пародонтальных карманов в 41% случаев ($p < 0.05$), изменение не происходило в 47.5% случаев, увеличение – в 11.5% случаев. На необработанных участках десны данные значения составляли 24%, 62.5% и 13.5% соответственно. Клинический уровень прикрепления десны после ЛФ уменьшился в 47% случаев ($p < 0.05$), увеличился в 18%, не изменился в 35% случаев. На необработанных участках десны данные значения составляли 23.5%, 49% и 27.5% соответственно.

Таким образом, было продемонстрировано, что однократная лазерная обработка с дозами 1.3 кДж/см^2 и 1.9 кДж/см^2 способна улучшить состояние десны, что позволяет рассматривать ЛФ в качестве перспективного метода лечения воспалительных заболеваний пародонта.

3.5.3. Оценка возможности применения лазерного фототермолиза при удалении локальной гиперпигментации десны человека

Целью данного этапа была возможности применения ЛФ для удаления локальной гиперпигментации десны. Для удаления локальной гиперпигментации десны была апробирована доза облучения 1.3 кДж/см^2 .

В ходе и непосредственно после лазерного воздействия пациент отметил незначительное терпимое жжение и небольшое покалывание в области обработки на следующий день после процедуры, других неприятных ощущений не отмечено (рис. 37, а, б). Через неделю после первой обработки отмечалось заметное обесцвечивание области, но с сохранением зон отложения меланина. Заживающие колонки наблюдались в виде точечных углублений на поверхности десны.



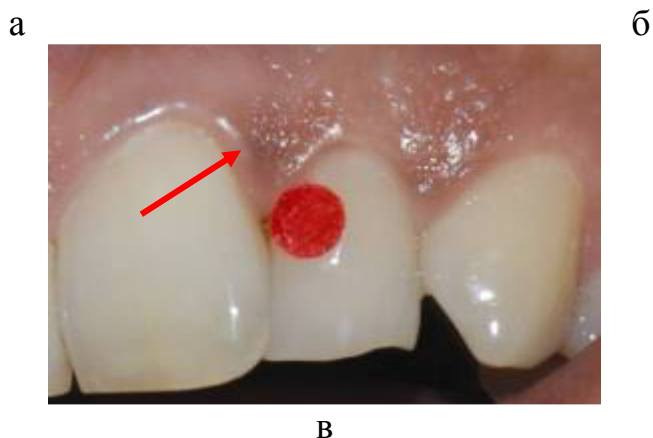


Рис. 37. Десна с локальной гиперпигментацией: а - до обработки; б - непосредственно после первой обработки; в - через 1 недели после первой обработки (уменьшение степени пигментации). Стрелкой обозначена область гиперпигментации.

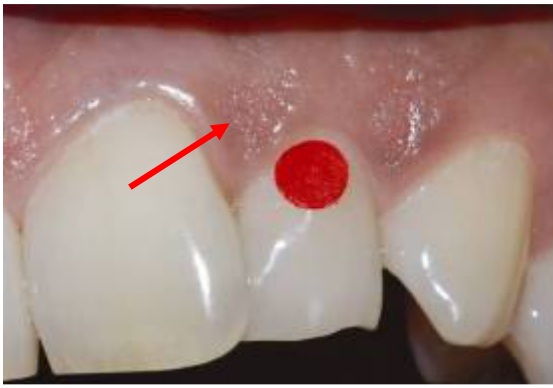
Полное визуальное заживление отмечалось через две недели после первой обработки. Текстура поверхности восстановилась, однако наблюдалось неравномерное распределение пигмента, с большим количеством у медиального края пятна (рис. 37, в). В связи с этим была проведена повторная обработка (рис. 38).



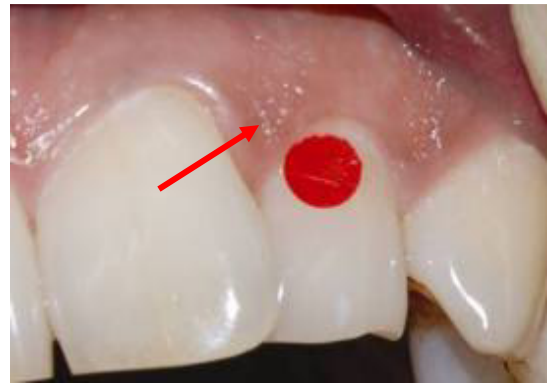
Рис. 38. Десна с локальной гиперпигментацией непосредственно после повторной обработки. Стрелкой обозначена область гиперпигментации.

Через две недели после повторной обработки наблюдались ровная и блестящая поверхность, полное отсутствие гиперпигментации и каких-либо видимых следов от колонок (рис. 39, а)

Через 1,5 месяца после повторной обработки гладкая и блестящая поверхность без признаков репигментации сохранялась (рис. 39, б).



а



б

Рис. 39. Десна с участком пигментации: а - заживление через 2 недели после повторной обработки (полное исчезновение); б - через 1,5 месяца после повторной обработки (полное обесцвечивание пигмента). Стрелкой обозначена область гиперпигментации.

Таким образом, показана возможность использования метода ЛФ для удаления локальной гиперпигментации десны.

Глава 4. Обсуждение результатов

Разработка эффективных и менее травматичных методов лечения воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта остается актуальной задачей для стоматологии. В данной работе впервые было проведено исследование воздействия ЛФ на десну животных и человека, а также оценка процессов заживления и регенерации тканей после лазерного фототермолиза: гистологическим методом с применением специфических окрасок и методом КП ОКТ, позволившим провести неинвазивную оценку состояния тканей после ЛФ.

Наше исследование является первой попыткой использования ЛФ на слизистой оболочке полости рта в норме и при патологии.

Классический вариант заживления раны представляет собой сложный процесс, состоящий из четырех основных последовательных и перекрывающихся, регулируемых несколькими факторами этапов: воспаление, пролиферация, ремоделирование (регенерация, восстановление). Известно, что полное восстановление ткани происходит к 25 суткам после повреждения. При этом пик реэпителизации отмечается на 5-7 сутки, с завершением данного процесса к 12 суткам, а ремоделирование коллагеновых волокон заканчивается к 20 суткам [69, 129].

Однако заживление раны на слизистой оболочке полости рта отличается по скорости заживления от кожных ран [60, 160]. Так, известно, что стадия воспаления и стадия реэпителизации ран слизистой оболочки полости рта короче, чем при кожных ранах [159]. В нашем исследовании полная реэпителизация отмечалась уже через 1-2 суток после обработки, как и при абляционном ЛФ кожи [127, 165]. Однако сразу после воздействия роговой слой был полностью разрушен, что сходно с данными по абляционной лазерной обработке кожи [99]. На наш взгляд именно быстрая реэпителизация слизистой оболочки сводит к минимуму риск заражения, а также возникновение и развитие нежелательных побочных эффектов (отек, эритема, нарушения пигментации) со временем при применении ЛФ. Однако

на 12 сутки после воздействия была выявлена повышенная функциональная активность эпителиальных клеток, в том числе интенсивный синтез кератогиалина и кератина, что, по-видимому, является причиной образования пара- и гиперкератоз, который, однако, не визуализировался на 20 сутки после ЛФ. Отметим, что паракератоз можно рассматривать и как обычное физиологическое состояние десны [27].

Многие исследования по гистологической оценке заживления кожи после лазерного фототермолиза выявили формирование микроскопических эпидермальных некротических остатков, которые включают в себя коагулированные остатки эпидермиса и дермы, мигрируют к поверхности кожи и удаляются через роговой слой [100, 99, 103, 119, 165]. Однако в наших исследованиях не наблюдалось аналогичной миграции таких остатков, что может быть объяснено более низким содержанием кератина в эпителии десны, по сравнению с кожей [16].

В ходе анализа полученных данных было показано, что на следующие сутки после воздействия в области колонок развивается выраженный воспалительный инфильтрат, который усиливает дезорганизацию поврежденного коллагена [83]. Данное обстоятельство может объяснить, почему наибольший размер колонок на препаратах, окрашенных ПСК, наблюдался именно на второй день после лазерной обработки, а не сразу после воздействия. Интенсивность клеточной инфильтрации достигает своего пика на 5 сутки после воздействия и заметно уменьшается на 12 сутки. Отметим, что при заживлении кожных ран максимум реактивного воспаления фиксируется также на 5-6 сутки [44, 69]. Кроме того, именно на 5 сутки отмечается полное окончание этапа реэпителизации кожных ран [44], что соответствует полученному нами результату гистологического исследования при лазерном воздействии на слизистую десны.

В нашем исследовании заживление и регенерация ткани подтверждалась не только появлением жизнеспособных эпителиальных клеток на препаратах, окрашенных нитросиним тетразолием, но и по

восстановлению красного свечения коллагена в поляризованном свете в области колонки на препаратах, окрашенных ПСК. На 12 сутки новый коллаген сформировался на всех уровнях структурной организации, что подтверждается восстановлением его поляризационных свойств, однако, его ориентация в субэпителиальном слое еще не имеет упорядоченной горизонтальной структуры, что свидетельствует о неокончательном восстановлении области воздействия. Несмотря на это, наши данные указывают на полное заживление слизистой оболочки полости рта на 20 сутки после воздействия, которое сохраняется и через 3 месяца без признаков рубцевания. Полученные нами данные хорошо согласуются как с данными по срокам заживления ран слизистой оболочки полости рта [160, 159], так и с данными по гистологическому анализу после лазерного фототермолиза [50, 68, 91, 118, 127].

Для неинвазивного прижизненного мониторинга состояния слизистой полости рта после лазерного воздействия нами был применен метод КП ОКТ. Известно, что сигнал в ко-поляризации является результатом обратного рассеяния зондирующего излучения и зависит от физических параметров частиц – рассеивателей, плотности их упаковки и оптических свойств. В области лазерного облучения образуется микрizona термического повреждения, что, в свою очередь, приводит к коагуляции эпителия и соединительной ткани. Поэтому существенно меняются все исходные свойства частиц – рассеивателей, что отражается в характере изменения сигнала на ОКТ изображении (его усилении или уменьшении) при лазерной обработке.

Анализируя сигнал на КП ОКТ изображении в кросс- поляризации, необходимо помнить, что он обусловлен наличием в ткани анизотропных структур, которые обладают свойством кросс-рассеивать и двулучепреломлять зондирующее излучение. Показано, что коллагеновые волокна соединительнотканной стромы в норме проявляют себя в кросс-поляризации как области с высоким уровнем сигнала [14, 19, 83]. После

нанесения колонки интенсивность сигнала в кросс-поляризации уменьшалась или исчезала полностью по сравнению с исходным уровнем. Таким образом, по КП ОКТ изображениям в реальном времени можно судить о структуре ткани и ее функциональном состоянии после ЛФ. Поэтому с помощью данного метода можно оценить эффективность сеанса обработки и выработать новую стратегию лечения в случае отсутствия улучшения.

Применение метода ОКТ для оценки состояния кожи после лазерного фототермолиза описывалось в нескольких работах [30, 146, 166]. Так в работе Tsai и соавторы показано, что ОКТ дает объективную информацию по срокам заживления кожи. По данным ОКТ заживление после неабляционной обработки занимает 6 дней, в то время как после абляционного воздействия – 14 дней [166]. Однако во всех представленных работах была использована традиционная ОКТ, которая дает представление об изменении ткани в целом, т.е. не способна дифференцировать изменения коллагенсодержащих от прочих структур ткани. В нашей работе применена КП ОКТ, которая позволяет отдельно оценивать уровень повреждения и дальнейшего восстановления коллагеновых волокон соединительной ткани и других, не анизотропных структур, что особенно важно при проведении процедуры ЛФ, в частности, для оценки возникновения нежелательных побочных эффектов, связанных с рубцеванием.

В нашем исследовании впервые была поставлена цель исследования возможность применения ЛФ для лечения воспалительных заболеваний полости рта человека. Для этого изначально нами была проведена оценка процессов повреждения и заживления тканей слизистой полости рта после лазерного фототермолиза гистологическими методами и прижизненно методом КП ОКТ. Анализ полученных данных показал, что на 20 сутки после воздействия структура ткани была восстановлена, но с сохранением отека в соединительной ткани и повышенной васкуляризации. На 90 сутки не было выявлено образование нежелательных побочных эффектов (образование рубца, эритема нарушения пигментации).

На следующем этапе работы перед началом клинического применения метода ЛФ были определены оптимальные по уровню боли режимы облучения. Так для клинического применения использовались режимы для лазерного фототериолиза с дозами 1.3 кДж/см² и 1.9 кДж/см². Отметим, что непосредственно во время обработки пациенты не отмечали дискомфорт или болезненные ощущения. Кроме того, через 3 месяца после лечения не было отмечено возникновения нежелательных побочных эффектов (эритема, отек, увеличение чувствительности, инфекции).

Оценка частоты и длительности возникающих побочных эффектов после неабляционного и абляционного лазерного фототермолиза кожи проводилась во многих работах. Так в работе Lee и соавторы было показано, что лишь у 5% пациентов возникают нежелательные побочные эффекты после процедуры. При этом наиболее часто встречающимися являются эритема (1.8%), поствоспалительная гиперпигментация (1.1%) (образование темных пятен на месте воспалительного процесса или повреждения кожи, в том числе, при проведении косметических процедур) и увеличение меланодермии (0.9%), наиболее редкими – появление простого герпеса (0.6%) и угревой сыпи (0.2%). При этом отдаленных побочных эффектов обнаружено не было [122]. Также к нежелательным побочным эффектам можно отнести умеренную или кратковременную боль во время процедуры и увеличение чувствительности обработанных участков непосредственно после обработки. Однако эти эффекты обнаружены лишь у нескольких пациентов и выражены минимально [107, 108, 122]. К нежелательным эффектам абляционного ЛФ можно отнести более сильный дискомфорт во время процедуры и непосредственно после нее по сравнению с неабляционным ЛФ. Показано, что у всех пациентов наблюдается эритема и отек в течение, как минимум, первых 2х недель после лечения [170].

Анализ данных по лечению воспалительных заболеваний пародонта выявил существенное клиническое улучшение состояния слизистой полости рта, а именно уменьшение глубины пародонтальных карманов и уменьшение

клинического уровня прикрепления, через 3 месяца после обработки. Вероятно, такая эффективность лазерной обработки связана с полной коагуляцией эпителия и дермы в месте воздействия и последующего образования нового коллагена. Известно, что пародонтит – это воспалительный процесс, при котором происходит нарушение целостности периодонтальных связок, удерживающих зуб в альвеоле, кортикальной пластинки кости, окружающей зуб, и резорбция костной ткани [13]. Таким образом, при ЛФ происходит замещение патологически измененных коллагеновых волокон на здоровые, что в свою очередь способствует лучшему удержанию зубов.

Насколько нам известно, не существует работ по применению ЛФ для лечения воспалительных заболеваний пародонта. Однако имеется много исследований, демонстрирующих эффективность лазерного фототермолиза при обработке постакне (рубцы, возникающие на месте угревой сыпи). Известно, что акне (угревая сыпь) является воспалительным заболеванием кожи, поэтому постакне образуются из грануляционной ткани [5], т.е. в принципе пародонтит и постакне должны иметь сходные морфологические изменения коллагеновых волокон, на восстановление которых, в основном, и направлен ЛФ.

В работе L. Vincini с соавторами [51] показано, что при использовании абляционного ЛФ эрбиевым лазером через 6 месяцев после окончания лечения наблюдалось заметное улучшение у 98% пациентов со II степенью тяжести и у 83% пациентов с III степенью тяжести рубцов после угревой сыпи. Применение абляционной обработки CO₂-лазером показало свою эффективность не только в лечении постакне, но и в общем улучшении состояния кожи [59]. Также в работе [170] выявлено значительное устойчивое улучшение внешнего вида постакне через 3 месяца после лечения у 87% пациентов при использовании абляционного лазерного фототермолиза. При этом ни в одной из работ не отмечено краткосрочных или долгосрочных осложнений, связанных с гиперпигментацией [59, 170].

В нашей работе впервые была проведена обработка очагов гиперпигментации десны методом ЛФ. Для полного удаления пигментных пятен понадобилось проведение двух сеансов обработки с дозой 1.3 кДж/см² с интервалом в две недели. Через две недели после повторной обработки отмечено полное отсутствие нарушений пигментации, которое сохранялось и через два месяца после обработки без признаков гипопигментации. По-видимому, лазерная обработка не только разрушает избыточное отложение меланина, но и стимулирует его выработку, тем самым способствует восстановлению нормального цвета слизистой.

В нашем исследовании однократная обработка с дозой 1.3 кДж/см² очагов гиперпигментации на слизистой не позволила полностью удалить пигментные пятна, что вероятно связано с недостаточной мощностью лазерного импульса, который не смог полностью разрушить отложения меланина в базальной мембране. Отметим, что в нашей работе при использовании ЛФ нежелательные побочные эффекты значительно меньше, чем при других описанных методах депигментации [113].

В литературе широко представлены данные по лечению неабляционным ЛФ различных пигментных нарушений кожи, связанных либо с недостаточным, либо с избыточным синтезом меланина [103, 140, 171]. Показано, что уже после двух обработок гипомеланоза (многочисленные депигментированные небольшие пятна на коже) эрбиевым лазером с длиной волны 1550 нм отмечалось статистически значимое отличие от контроля, при этом наблюдалось восстановление нормального цвета кожи [140]. Однако при лечении меланодермии (избыточное отложение меланина в коже) представлены противоречивые данные. В исследовании Karsai и соавторов не выявлено существенного улучшения при воздействии неабляционным эрбиевым лазером с длиной волны 1550 нм [103]. В то же время в работе Wanitphakdeedecha и соавторов при неабляционной обработке эрбиевым лазером с длиной волны 1410 нм показано, что индекс меланина

статистически значимо уменьшился относительно исходного уровня через 2 и 3 месяца [171].

На основании продолжительности процессов заживления и сравнения полученных нами данных с данными по применению ЛФ на коже [7575, 99, 105, 104, 123, 164, 176], нами было выдвинуто предположение о том, что интервал между последовательными обработками слизистой оболочки полости рта должен составлять, по крайней мере, 1 неделю. Такой перерыв между обработками позволит уменьшить неприятные ощущения, которые могут возникнуть после проведения процедуры из-за индивидуальной реакции пациента, и сократить до минимума риск развития нежелательных побочных эффектов.

В заключении отметим, что использование лазерного фототермолиза индуцирует регенерацию десны до исходного состояния, что позволяет рассматривать ЛФ в качестве перспективного метода лечения воспалительных заболеваний и нарушений пигментации слизистой оболочки полости рта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная диссертационная работа посвящена разработке методологии лазерного фототермолиза для регенерации тканей слизистой оболочки животных и человека, и применению метода кросс-поляризационной оптической когерентной томографии для прижизненной оценки его эффективности.

На первом этапе гистологическими методами была проведена оценка степени повреждения десны экспериментальных животных после лазерного воздействия в зависимости от дозы облучения. Показано, что непосредственно после воздействия при всех использованных дозах облучения наблюдались дезактивация ферментов, деструкция эпителия и коагуляции соединительной ткани на всей глубине повреждения. При вычислении размеров лазерных колонок было установлено, что размеры зон лазерного повреждения растут с увеличением дозы облучения. Чем больше была доза, тем на большую глубину повреждался подслизистый слой. При дозах облучения 1.3 кДж/см^2 , 1.9 кДж/см^2 и 2.5 кДж/см^2 зона поражения затрагивала соответственно 1.5%, 28% и 72% от общей толщины подслизистого слоя, которая составляла в среднем $1.95 \pm 0.03 \text{ мм}$. При наибольшей дозе 4.2 кДж/см^2 глубина лазерного повреждения составляла 82% от толщины подслизистого слоя. Однако в дальнейшем данная доза облучения не была использована из-за сильной боли животного при нанесении колонок, вероятно, за счет повреждения подслизистого слоя практически на всю его толщину, что может привести к увеличению периода заживления. Таким образом, воздействие ИК излучением с длиной волны 974 нм и дозами 1.3 кДж/см^2 , 1.9 кДж/см^2 и 2.5 кДж/см^2 приводит к полной коагуляции ткани в зоне локального лазерного воздействия с минимальным повреждением окружающих тканей.

На втором этапе работы проведен анализ динамики заживления десны животных и человека после различных доз лазерного облучения методами световой микроскопии и поляризационной микроскопии. Выявлено, что

заживление десны кроликов после ЛФ имело общие черты для всех доз облучения. При всех дозах облучения воспалительная фаза заживления начиналась через 1 сутки. Первые признаки восстановления эпителия, такие как базальноклеточная активность и инвагинация эпителия в область колонки, выявлялись на 1-2 сутки, новый эпителий формировался к 7-12 суткам. Регенерация соединительной ткани начиналась с повышенной пролиферации фибробластов, участвующих в производстве нового коллагена и формировании сети новых тонкостенных кровеносных сосудов на 3-5 сутки и заканчивалась к 20 суткам после ЛФ. Однако исследование показало, что сроки начала фаз заживления и период полного восстановления ткани для разных доз отличались – чем больше доза, тем позже запускаются и заканчиваются процессы восстановления ткани после ЛФ. При заживлении десны человека 3 сутки после ЛФ область повреждения была покрыта новым молодым эпителием, соединительная ткань восстановилась к 20 суткам, однако в ней еще сохранялась отек и повышенная васкуляризация. На 90 сутки не наблюдалось образования рубца или развития других нежелательных побочных эффектов (отек, эритема, нарушения пигментации) ни у кролика, ни у человека. Таким образом, процессы восстановления десны у кролика и у человека после ЛФ соответствовали классическим фазам заживления нелазерных (резанных) ран и заканчивались к 20-м суткам после воздействия. Важно, ЛФ не сопровождалось развитием побочных эффектов.

На третьем этапе работы была разработана методология применения кросс-поляризационной оптической когерентной томографии для мониторинга восстановления ткани десны животных и человека после лазерного фототермолиза. Показано, что КП ОКТ прижизненно отражает наиболее значительные этапы заживления десны после ЛФ, подтвержденные гистологическим анализом: реэпителизацию, разрушение структуры ткани с полной или частичной потерей коллагеном поляризующих свойств, восстановление исходной структуры ткани. Количественный анализ сигнала на КП ОКТ изображениях десны кролика после ЛФ показал, что к 12 суткам

после ЛФ СО ОКТ сигнала в кросс-поляризации возрастает по сравнению со значением непосредственно после воздействия, что соответствовало интенсивному восстановлению коллагена, выявленному при гистологическом анализе. СО достигало исходного значения к 90 суткам после ЛФ ($p < 0.05$), что свидетельствовало о восстановлении коллагена в области лазерного повреждения без признаков образования рубца. Таким образом, исследование показало, что метод КП ОКТ визуализирует зону лазерного повреждения и может служить прижизненным неинвазивным методом контроля процессов заживления десны ЛФ.

На последнем этапе работы на основании выполненных экспериментальных исследований были предложены и апробированы режимы ЛФ для минимально инвазивного лечения пародонтита и локальной гиперпигментации десны у человека. Показано, что в зависимости болевой чувствительности пациентов могут быть использованы дозы в диапазоне от 1.3 кДж/см² до 1.9 кДж/см².

Для лечения пародонтита легкой и средней степени тяжести были апробированы режимы однократного воздействия с дозами облучения 1.3 кДж/см² и 1.9 кДж/см². Через 3 месяца после ЛФ отмечено уменьшение глубины пародонтальных карманов в 41% случаев ($p < 0.05$), изменение не происходило в 47.5% случаев, увеличение – в 11.5% случаев. На необработанных участках десны данные значения составляли 24%, 62.5% и 13.5% соответственно. Клинический уровень прикрепления десны после ЛФ уменьшился в 47% случаев ($p < 0.05$), увеличился в 18%, не изменился в 35% случаев. На необработанных участках десны данные значения составляли 23.5%, 49% и 27.5% соответственно. Таким образом, было продемонстрировано, что использование лазерного фототермолиза с дозами 1.3 кДж/см² и 1.9 кДж/см² способствует улучшению клинического состояния полости рта.

Для удаления локальной гиперпигментации десны была апробирована доза лазерного облучения 1.3 кДж/см². Визуальное исчезновение пигментных

пятен на десне отмечено через 2 недели после повторной лазерной обработки с интервалом в 2 недели, при этом депигментация устойчиво сохранялась и через 1,5 месяца. Таким образом, обработка очагов гиперпигментации с помощью метода ЛФ продемонстрировала очевидный положительный результат без нежелательных побочных эффектов (боль во время процедуры, инфекция, рецессия десны и др.).

В данной работе впервые продемонстрирована возможность ЛФ для лечения пародонтита и удаления локальной гиперпигментации десны, что позволяет рассматривать ЛФ в качестве перспективного способа лечения патологий пародонта.

Полученные в нашей работе результаты могут стать основой для разработки методики минимально инвазивного лечения заболеваний слизистой оболочки полости рта, включающих пародонтит и гиперпигментацию десны, с помощью ЛФ, а также методики прижизненного наблюдения с помощью метода кросс-поляризационной оптической когерентной томографии процессов заживления ткани после ЛФ.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при проведении лазерного фототермолиза ИК излучением с длиной волны 974 нм и дозами 1.3 кДж/см², 1.9 кДж/см² и 2.5 кДж/см² возникают зоны локального лазерного повреждения, размер которых составляет: глубина – 0.03 мм, 0.54 мм и 1.6 мм, диаметр – 0.14 мм, 0.30 мм и 0.60 мм соответственно.
2. Динамика заживления десны кролика и человека после лазерного фототермолиза соответствует фазам заживления нелазерных (резанных) ран. Установлено, что при ИК облучении с длиной волны 974 нм и дозами 1.3 кДж/см², 1.9 кДж/см² и 2.5 кДж/см² восстановление ткани начинается на 1-3 сутки и заканчивается к 20-м суткам после облучения. Исследование состояния ткани в течение 90 суток не обнаружило возникновения нежелательных побочных эффектов в зоне лазерного повреждения и окружающих тканях.
3. Динамика изменений КП ОКТ изображений слизистой оболочки полости рта животных и человека после лазерного фототермолиза соответствует тканевым изменениям, выявленным при гистологическом анализе.
4. КП ОКТ позволяет визуализировать зону локального лазерного повреждения после лазерного фототермолиза в виде области с нарушенной слоистой структурой на ко-поляризационных и отсутствием сигнала от соединительной ткани на кросс-поляризационных изображениях, а также проводить мониторинг заживления ткани по восстановлению слоистой структуры на ко-поляризационных и интенсивности сигнала на кросс-поляризационных изображениях.
5. Разработаны режимы лазерного воздействия для лечения патологических состояний пародонта человека. Показано, что однократное ИК облучение с длиной волны 974 нм и дозами 1.3 кДж/см² и 1.9 кДж/см² является эффективным для лечения пародонтита, а двукратное облучение с

интервалом 2 недели и дозой 1.3 кДж/см^2 – для удаления локальной гиперпигментации десны.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор считает своей приятной обязанностью выразить глубокую благодарность: научному руководителю д.м.н. профессору Гладковой Наталье Дорофеевне за помощь, оказанную на всех этапах выполнения диссертации; к.б.н. Ширмановой Марине Вадимовне, к.ф.-м.н. Фельдштейну Феликсу Исааковичу, к.б.н. Киселевой Елене Борисовне, к.б.н. Сироткиной Марине Александровне, Кузнецовой Дарье Сергеевне, Елагину Вадиму Вячеславовичу за помощь в подготовке и обсуждении диссертационной работы, в обработке и интерпретации полученных в диссертационной работе данных.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аветисян А.А. Клиника и терапия хронического генерализованного пародонтита у пациентов пожилого возраста: дис. ... канд. мед. наук. / А.А. Аветисян. – Москва, 2008.
2. Адмакин О.И. Стоматологическая заболеваемость детского и взрослого населения в различных климато-географических регионах России / О.И. Адмакин, А.А. Мамедов // Профилактика стоматологических заболеваний. – 2004. №. 9. – С. 14-17.
3. Афанасьев Ю.И. Гистология / Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина. - Москва: Медицина, 1999 - 744 с.
4. Баграташвили В.Н. Лазерная инженерия хрящей / В.Н. Баграташвили, Э.Н. Соболев, А.Б. Шехтер. – Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2006. – 488 с.
5. Байтингер В.Ф. Морфофункциональные особенности патологических кожных рубцов: состояние вопроса / В.Ф. Байтингер, К.Г. Пайтян // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2013. – Т. 1, №. 44. – С. 28-34.
6. Беликов А.В. Лазерные биомедицинские технологии / А.В. Беликов, А.В. Скрипник. – СПб: СПбГУ ИТМО, 2008. – 116 с.
7. Берлиен Х.П. Прикладная лазерная медицина. Учебное и справочное пособие / Х.П. Берлиен. – Москва: Интерэксперт, 1997. – 356 с.
8. Боровской Е.В. Терапевтическая стоматология: Учебник для студентов медицинских вузов / Е.В. Боровской. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2003. - 840 с.
9. Владимиров Ю.А. Лазерная терапия: настоящее и будущее / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №. 12. – С. 2-8.
10. Геликонов В.М. Волоконно-оптические реализации метода кросс-поляризационной оптической когерентной томографии для эндоскопических исследований / В.М. Геликонов, Г.В. Геликонов // Квантовая электроника. – 2008. – Т. 38, №. 7. – С. 634-640.

11. Гладкова Н.Д. Оптическая когерентная томография в исследовании зубов и периодонтальных тканей. Сообщение I / Н.Д. Гладкова, Ю.В. Фомина, А.А. Мураев и др. // Институт стоматологии. – 2010. – Т. 48, №. 3. – С. 50-51.
12. Гладкова Н.Д. Оптическая когерентная томография в исследовании слизистой оболочки полости рта. Сообщение II / Н.Д. Гладкова, А.В. Цимбалистов, Ю.В. Фомина и др. // Институт стоматологии. – 2011. – Т. 49, №. 1. – С. 75-77.
13. Грудянов А.И. Заболевания пародонта / А.И. Грудянов. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2009. – 336 с.
14. Губарькова Е.В. Разработка способа обнаружения нестабильной атеросклеротической бляшки методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии / Е.В. Губарькова // дисс. канд-та биол. наук: 03.01.02. . – 2016.
15. Гуров И.П. Формирование и анализ стохастических интерференционных полей. Проблемы когерентной и нелинейной оптики / И.П. Гуров, С.А. Козлов // СПбГИТМО. – 2000. – 278 с.
16. Диденко И.Ю. Структурно-функциональная организация слизистой оболочки полости рта у человека в норме / И.Ю. Диденко, А.В. Петров, В.В. Спицин // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2012. – Т. 1, №. 4. – С. 9-24.
17. Звелто О. Принципы лазеров / О. Звелто. – СПб: Лань, 2008. – 720 с.
18. Карабут М.М. Применение фракционного лазерного фототермолиза в клинической практике. Обзор литературы / М.М. Карабут, Н.Д. Гладкова, Ф.И. Фельдштейн и др. // Современные технологии в медицине. – 2010. – Vol. 4. – P. 115-121.
19. Киселева Е.Б. Метод кросс-поляризационной оптической когерентной томографии для прижизненной оценки состояния коллагеновых волокон / Е.Б. Киселева // дисс. канд-та биол. наук: 03.01.02. . – 2014.

20. Лукиных Л.М. Болезни пародонта (клиника, диагностика, лечение и профилактика) / Л.М. Лукиных, Е.Н. Жулев, И.Н. Чупрунова. – Нижний Новгород: НижГМА, 2005. – 322 с.
21. Лукиных Л.М. Хронический генерализованный пародонтит. Часть I. Современный взгляд на этиологию и патогенез / Л.М. Лукиных, Н.В. Круглова // Современные технологии в медицине. – 2011. – Т. 3, №. 1. – С. 123-125.
22. Лукиных Л.М. Хронический генерализованный пародонтит. Часть II. Современные методы лечения и профилактики / Л.М. Лукиных, Н.В. Круглова // Современные технологии в медицине. – 2011. – Т. 3, №. 2. – С. 140-142.
23. Никоноров Н.В. Оптическое материаловедение: методы исследования оптических материалов (учебное пособие по выполнению лабораторного практикума) / В.А. Асеев, А.М. Ефимов. - СПб: СПбГУ ИТМО, 2008. - 156 с.
24. Павлова В.Н. Хрящ / Т.Н. Копьева, Л.И. Слуцкий и др. - Медицина: Москва, 1998. - 320 с.
25. Петрищева Н.Н. Применение полупроводниковых лазеров в дерматологии и косметологии: Пособие для врачей / Н.Н. Петрищева, Е.В. Соколовский. – СПб: СПбГМУ, 2001. – 125 с.
26. Приезжев А.В. Лазерная диагностика в биологии и медицине / А.В. Приезжев, В.В. Тучин, Л.П. Шубочкин. – Москва: Наука, 1989. – 240 с.
27. Сахарук Н. А. Болезни периодонта: клиника, диагностика, профилактика и лечение / Н.А. Сахарук, М.Н. Волкова. – Витебск: ВГМУ, 2014. – 195 с.
28. Серебряков В.А. Лазерные технологии в медицине / В.А. Серебряков. – СПб: НИУ ИТМО, 2009. – 266 с.
29. Сюй А.В. Оптика (учебное пособие) / А.В. Сюй. - ДВГУПС, 2008. - 234 с.

30. Ahn Y. Quantitative monitoring of laser-treated engineered skin using optical coherence tomography / Y. Ahn, C.Y. Lee, S. Baek [et al.] // *Biomed Opt Express*. – 2016. – Vol. 24, N. 3. – P. 1030-1041.
31. Aldahan A.S. Laser and Light Treatments for Striae Distensae: A Comprehensive Review of the Literature / A.S. Aldahan, V.V. Shah, S. Mlacker [et al.] // *Am J Clin Dermatol*. – 2016.
32. Alexiades-Armenakas M.R. The spectrum of laser skin resurfacing: nonablative, fractional, and ablative laser resurfacing / M.R. Alexiades-Armenakas, J.S. Dover, K.A. Arndt // *J Am Acad Dermatol* – 2008. – Vol. 58, N. 5. – P. 719—737.
33. Alexis A.F. Nonablative Fractional Laser Resurfacing for Acne Scarring in Patients With Fitzpatrick Skin Phototypes IV-VI / A.F. Alexis, M.K. Coley, R.I. Nijhawan [et al.] // *Dermatol Surg*. – 2016. – Vol. 42, N. 3. – P. 392-402.
34. Allemann B.I. Fractional photothermolysis - an update. / B.I. Allemann, J. Kaufman // *Lasers in Medical Science* –2010. – Vol. 25, N. 1. – P. 137-144.
35. Almas K. Surgical treatment of melanin-pigmented gingiva; an esthetic approach / K. Almas, W. Sadig // *Indian J Dent Res*. – 2002. – Vol. 13, N. 2. – P. 70-73.
36. Alqahtani S.M. Management of gingival hyperpigmentation by the surgical abrasion: A case report / S.M. Alqahtani // *International Journal of Medical and Dental Case Reports International Journal of Medical and Dental Case Reports*. – 2015. – P. 1-3.
37. Anderson R.R. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation / R.R. Anderson, J.A. Parrish // *Science*. – 1983. – Vol. 220, N. 4596. – P. 524-527.
38. Arany P.R. Activation of latent TGF-beta1 by low-power laser in vitro correlates with increased TGF-beta1 levels in laser-enhanced oral wound healing / P.R. Arany, R.S. Nayak, S. Hallikerimath [et al.] // *Wound Repair Regen*. – 2007. N. 15. – P. 866-874.

39. Atalay M. Heat shock proteins in diabetes and wound healing / M. Atalay, N. Oksala, J. Lappalainen [et al.] // *Curr Protein Pept Sci.* – 2009. – Vol. 10, N. 1. – P. 85-95.
40. Augustyniak A. Fractional non - ablative laser treatment 1410 nm for periorbital wrinkles - reviscometrical and clinical evaluation / A. Augustyniak, H. Rotsztein // *J Cosmet Laser Ther.* – 2016. – Vol. 10. – P. 1-14.
41. Azzam O.A. Treatment of hypertrophic scars and keloids by fractional carbon dioxide laser: a clinical, histological, and immunohistochemical study / O.A. Azzam, D.A. Bassiouny, E.-H. M.S. [et al.] // *Lasers Med Sci.* – 2015.
42. Bagayev S.N. Optical coherence tomography for in situ monitoring of laser corneal ablation / S.N. Bagayev, V.M. Gelikonov, G.V. Gelikonov // *Journal of Biomedical Optics.* – 2002. – Vol. 7, N. 4. – P. 633-642.
43. Banihashemi M. Efficacy of fractional CO2 laser in treatment of atrophic scar of cutaneous leishmaniasis / M. Banihashemi, Y. Nahidi, M. Maleki [et al.] // *Lasers Med Sci.* – 2016.
44. Baranoski S. Wound care essentials : practice principles / S. Baranoski, E.A. Ayello. – Philadelphia: Wolters Kluwer, 2015. – 593 p.
45. Basford J.R. Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low intensity Nd:YAG laser irradiation on lateral epicondylitis / J.R. Basford, C.G. Sheffield, K.R. Cieslak // *Archives of Physical Medicine & Rehabilitation.* – 2000. – Vol. 81, N. 11. – P. 1504-1510.
46. Baum J. Folding of peptide models of collagen and misfolding in disease / J.B. Baum // *Current Opinion in Structural Biology.* – 1999. – Vol. 9, N. 1. – P. 122-128.
47. Bazant-Hegemark, F. Near real-time classification of optical coherence tomography data using principal components fed linear discriminant analysis / Bazant-Hegemark, N. F. Stone // *J. Biomed. Opt.* – 2008. – Vol. 13. – P. 034002

48. Bazant-Hegemark F. Towards automated classification of clinical optical coherence tomography data of dense tissues / F. Bazant-Hegemark, N. Stone // *Lasers Med. Sci.* – 2009. – Vol. 24, N. 4. – P. 627-638.
49. Bazin R. Clinical study on the effects of a cosmetic product on dermal extracellular matrix components using a high-resolution multiphoton tomography / R. Bazin, F. Flament, A. Colonna // *Skin Research and Technology.* – 2010. – Vol. 16. – P. 305-310.
50. Bedi V.P. The effects of pulse energy variations on the dimensions of microscopic thermal treatment zones in nonablative fractional resurfacing / V.P. Bedi, K.F. Chan, R.K. Sink [et al.] // *Lasers Surg Med.* – 2007. – Vol. 39. – P. 145-155.
51. Bencini L. Nonablative fractional photothermolysis for acne scars: clinical and in vivo microscopic documentation of treatment efficacy / L. Bencini, A. Tournalaki, M. Galimberti [et al.] // *Dermatologic Therapy.* – 2012. – Vol. 25, N. 5. – P. 463-467.
52. Berger N. *Veterinary laser surgery a practical guide* / N. Berger, P.H. Eeg. – Blackwell Publishing, 2006. – 236 p.
53. Berlin A.L. A prospective study of fractional scanned nonsequential carbon dioxide laser resurfacing: a clinical and histopathologic evaluation / A.L. Berlin, M. Hussain, R. Phelps [et al.] // *Dermatol Surg.* – 2009. – Vol. 35, N. 2. – P. 222-8.
54. Bernstein L.J. The short- and long-term side effects of carbon dioxide laser resurfacing / L.J. Bernstein, A.N. Kauvar, M.C. Grossman [et al.] // *Dermatol Surg.* – 1997. – Vol. 23, N. 7. – P. 519-25.
55. Borges L. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions / L. Borges, P. Gutierrez, H. Marana [et al.] // *Micron.* – 2007. – Vol. 38, N. 6. – P. 580-583.

56. Brezinski M.E. Optical coherence tomography: principles and applications / M.E. Brezinski. – Boston: Academic Press: Amsterdam, 2006. – 599 p.
57. Brigger D. Comparison Of Sirius Red And Congo Red As Stains For Amyloid In Animal Tissues / D. Brigger, T.J. Muckle // Journal Of Histochemistry and Cytochemistry. – 1975. – Vol. 23, N. 1. – P. 84-88.
58. Cachafeiro T. Comparison of Nonablative Fractional Erbium Laser 1,340 nm and Microneedling for the Treatment of Atrophic Acne Scars: A Randomized Clinical Trial / T. Cachafeiro, G. Escobar, G. Maldonado [et al.] // Dermatol Surg. – 2016. – Vol. 42, N. 2. – P. 232-41.
59. Chapas A.M. Successful treatment of acneiform scarring with CO2 ablative fractional resurfacing / A.M. Chapas, L. Brightman, S. Sukal [et al.] // Lasers Surg Med. – 2008. – Vol. 40, N. 6. – P. 381-6.
60. Chen L. Positional differences in the wound transcriptome of skin and oral mucosa / L. Chen, Z.H. Arbieva, S. Guo [et al.] // BMC Genomics. – 2010. – Vol. 11. – P. 471.
61. Chen P.S. Diode laserassisted excision of glomus tympanicum tumor: do diode lasers help in hemostasis and tumor removal / P.S. Chen, C.Y. Kuo, H.C. Chen [et al.] // Journal of Medical Science. – 2013. – Vol. 33, N. 4. – P. 221-224.
62. Chitvanich S. Combination of non-ablative fractional photothermolysis and 0.1% tacrolimus ointment is efficacious for treating idiopathic guttate hypomelanosis / S. Chitvanich, P. Rerknimitr, R. Panchaprateep [et al.] // J Dermatolog Treat. – 2016. – P. 1-5.
63. Cobb C. M. Lasers and the treatment of chronic periodontitis / C.M. Cobb, S.B. Low, D.J. Coluzzi // Dent Clin North Am. – 2010. – Vol. 54, N. 1. – P. 35-53.
64. de Boer J.F Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography / J.F. de Boer, S.M. Srinivas, J.S. Nelson // In: Handbook of Optical Coherence Tomography / Edited by B.E. Bouma and G.J. Tearney. – New York, Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. – P. 237-274.

65. de Boer J.F. Polarization effects in optical coherence tomography of various biological tissues / J.F. de Boer, S.M. Srinivas, B.H. Park [et al.] // IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. – 1999. – Vol. 5, N. 4. – P. 1200-1204.
66. Deas D.E. Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis / D.E. Deas, A.J. Moritz, R.S. Sagun [et al.] // Periodontol 2000. – 2016. – Vol. 71, N. 1. – P. 128-139.
67. Del Peloso Ribeiro E. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study / E. Del Peloso Ribeiro, S. Bittencourt, E.A. Sallum [et al.] // J Clin Periodontol. – 2008. – Vol. 35, N. 9. – P. 789-98.
68. Dierickx C.C. Micro-fractional ablative skin resurfacing with two novel erbium laser systems / C.C. Dierickx, K.A. Khatri, Z.S. Tannous [et al.] // Lasers Surg Med. – 2008. – Vol. 40, N. 2. – P. 113-23.
69. DiPietro L.A. Wound Healing: Methods and Protocols / L.A. DiPietro. – Springer Science & Business Media, 2003. – 467 p.
70. Finney R. Non-ablative fractional resurfacing in the treatment of scar contracture / R. Finney, R. Torbeck, N. Saedi // Lasers Surg Med. – 2016. – Vol. 48, N. 2. – P. 170-3.
71. Firooz A. Treatment of atrophic facial acne scars with fractional Er:YAG laser in skin photo type III - IV: a pilot study / A. Firooz, A.R. Estarabadi, M.H. Kashani // J Cosmet Laser Ther. – 2016. – Vol. 10. – P. 1-16.
72. Fisher G.H. Concurrent use of handheld forced cold air device minimized patient discomfort during fractional photothermolysis / G.H. Fisher, K. K.H., L.J. Berstein [et al.] // Dermatol Surg – 2005. – Vol. 31, N. 9. – P. 1242-1244.
73. Fornaini C. New clinical approach for use of Er:YAG laser in the surgical treatment of oral lichen planus: a report of two cases / C. Fornaini, H. Raybaud, C. Augros [et al.] // Photomedicine and Laser Surgery. – 2012. – Vol. 30, N. 4. – P. 234-238.

74. Franck P. Basics of Lasers: History, Physics, and Clinical Applications / P. Franck, P.W. Henderson, K.O. Rothaus // Clin Plast Surg. – 2016. – Vol. 43, N. 3. – P. 505-513.
75. Friedmann D.P. Treatment of facial photodamage and rhytides using a novel 1,565 nm non-ablative fractional erbium-doped fiber laser / D.P. Friedmann, J.E. Tzu, A.N. Kauvar [et al.] // Lasers Surg Med. – 2016. – Vol. 48, N. 2. – P. 174-80.
76. Funayama A. Electron Probe Microanalysis of Exogenous Pigmentation of Oral Mucosa Originating from Dental Alloy: Two Case Reports / A. Funayama, T. Mikami, K. Niimi [et al.] // Open Journal of Stomatology. – 2016. – Vol. 6, N. 4. – P. 120-126.
77. Gallucci R.M. IL-6 modulates alpha-smooth muscle actin expression in dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice / R.M. Gallucci, E.G. Lee, J.J. Tomasek // J Invest Dermatol. – 2006. – Vol. 126, N. 3. – P. 561-568.
78. Gan S.D. Ablative fractional laser therapy for the treatment of actinic keratosis: A split-face study / S.D. Gan, S.H. Hsu, G. Chuang [et al.] // J Am Acad Dermatol. – 2016. – Vol. 74, N. 2. – P. 387-9.
79. Garcia Canas P. Effectiveness of systemic antimicrobial therapy in combination with scaling and root planing in the treatment of periodontitis: a systematic review / P. Garcia Canas, I. Khouly, J. Sanz [et al.] // J Am Dent Assoc. – 2015. – Vol. 146, N. 3. – P. 150-163.
80. Gelikonov V.M. New approach to cross-polarized optical coherence tomography based on orthogonal arbitrarily polarized modes / V.M. Gelikonov, G.V. Gelikonov // Laser Phys Lett. – 2006. – Vol. 3, N. 9. – P. 445-451.
81. Geronemus R.G. Fractional photothermolysis: current and future applications / R.G. Geronemus // Lasers Surg Med. – 2006. – Vol. 38, N. 3. – P. 169-176.
82. Giattina S.D. Assessment of coronary plaque collagen with polarization sensitive optical coherence tomography (PS-OCT) / S.D. Giattina, B.K.

- Courtney, P.R. Herz [et al.] // *Int J Cardiol.* – 2006. – Vol. 107, N. 3. – P. 400-409.
83. Gladkova N. Evaluation of oral mucosa collagen condition with cross-polarization optical coherence tomography / N. Gladkova, E. Kiseleva, N. Robakidze [et al.] // *J Biophotonics.* – 2013. – Vol. 6, N. 3. – P. 321-329.
84. Gladkova N.D. Optical coherence tomography in dentistry / N.D. Gladkova, Y.V. Fomina, E.B. Kiseleva [et al.] // In: *Handbook of Biophotonics. Photonics for Health Care.* / Edited by J. Popp, et al. – WileyVCH, 2012. – P.1008-1015.
85. Glaich A.S. Fractional resurfacing for the treatment of hypopigmented scars: a pilot study / A.S. Glaich, Z. Rahman, L.H. Goldberg [et al.] // *Dermatol Surg.* – 2007. – Vol. 33, N. 3. – P. 289-294.
86. Goldberg D.J. Histologic and ultrastructural analysis of melasma after fractional resurfacing / D.J. Goldberg, A.L. Berlin, R. Phelps // *Lasers Surg Med.* – 2008. – Vol. 40, N. 2. – P. 134-138.
87. Goldman M. Intense pulse light and nonablative approaches to photoaging / M. Goldman, R. Weiss // In: *Photoaging* / Edited by Marcel Dekker, Inc, 2004. – P. 165-183.
88. Goldman M.P. *Lasers and Energy Devices for the Skin* / Ed. M.P. Goldman, R.E. Fitzpatrick, V. Ross [et al.]: CRC Press, 2013. – 400 p.
89. Gondak R.O. Oral pigmented lesions: Clinicopathologic features and review of the literature / R.O. Gondak, R. da Silva-Jorge, J. Jorge [et al.] // *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* – 2012. – Vol. 17, N. 6. – P. 919-924.
90. Haisa M. Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF / M. Haisa, H. Okochi, G.R. Grotendorst // *J Invest Dermatol.* – 1994. – Vol. 103, N. 4. – P. 560-563.
91. Hantash B.M. In vivo histological evaluation of a novel ablative fractional resurfacing device / B.M. Hantash, V.P. Bedi, B. Kapadia [et al.] // *Lasers Surg Med.* – 2007. – Vol. 39, N. 2. – P. 96-107.

92. Hantash B.M. Laser-induced transepidermal elimination of dermal content by fractional photothermolysis / B.M. Hantash, V.P. Bedi, S.K. Struck [et al.] // *J Biomed Opt.* – 2006. – Vol. 11, N. 4. – P. 041115.
93. He F. Clinical research of early laryngocarcinoma treatment by carbon dioxide laser microsurgery / F. He, Y. Wang, W. Chen [et al.] // *Journal of Clinical Otorhinolaryngology – Head & Neck Surgery.* – 2014. – Vol. 28, N. 7. – P. 492-495.
94. Helbig D. Human skin explant model to study molecular changes in response to fractional photothermolysis: spatio temporal expression of HSP70. / D. Helbig, M. Bodendorf, U. Anderegg [et al.] // *Medical laser application.* – 2010. – Vol. 25, N. 3. – P. 173-180.
95. Helbig D. Molecular changes during skin aging and wound healing after fractional ablative photothermolysis / D. Helbig, U. Paasch // *Skin Res Technol.* – 2011. – Vol. 17, N. 1. – P. 119-129.
96. Helbig D. Nonablative skin rejuvenation devices and the role of heat shock protein 70: results of a human skin explant model / D. Helbig, A. Moebius, J.C. Simon [et al.] // *J. Biomed. Opt.* – 2010. – Vol. 15, N. 3. – P. 038002.
97. Hsiao F.C. Recent Advances in Fractional Laser Resurfacing: New Paradigm in Optimal Parameters and Post-Treatment Wound Care / F.C. Hsiao, G.N. Bock, D.B. Eisen // *Advances in wound care.* – 2012. – Vol. 1, N. 5. – P. 207-212.
98. Jacques S.L. Laser-tissue interactions. Photochemical, photothermal, and photomechanical / S.L. Jacques // *The Surgical clinics of North America.* – 1992. – Vol. 72, N. 3. – P. 531-558.
99. Jih M. H. Fractional photothermolysis: a review and update / M.H. Jih, A. Kimyai-Asadi // *Semin Cutan Med Surg.* – 2008. – Vol. 27, N. 1. – P. 63-71.
100. Jih M.H. Fractional photothermolysis for photoaging of hands / M.H. Jih, L.H. Goldberg, A. Kimyai-Asadi // *Dermatol Surg.* – 2008. – Vol. 34, N. 1. – P. 73-78.

101. Junqueira L. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection / L. Junqueira, G. Bignolas, R. Brentani // *The Histochemical Journal*. – 1979. – Vol. 11, N. 4. – P. 447-455.
102. Karsai S. Ablative fractional lasers (CO₂ and Er:YAG): a randomized controlled doubleblind split-face trial of the treatment of peri-orbital rhytides / S. Karsai, A. Czarnecka, M. Junger [et al.] // *Lasers Surg Med*. – 2010. – Vol. 42, N. 2. – P. 160-167.
103. Karsai S. Is non-ablative 1550-nm fractional photothermolysis an effective modality to treat melasma? Results from a prospective controlled single-blinded trial in 51 patients / S. Karsai, T. Fischer, L. Pohl, Schmitt, L. [et al.] // *J Eur Acad Dermatol Venereol*. – 2012. – Vol. 26, N. 4. – P. 470-6.
104. Katz T.M. Fractional photothermolysis for the treatment of postinflammatory hyperpigmentation / T.M. Katz, L.H. Goldberg, B.F. Firoz [et al.] // *Dermatol Surg*. – 2009. – Vol. 35, N. 11. – P. 1884.
105. Katz T.M. Treatment of melasma using fractional photothermolysis: a report of eight cases with long-term follow-up. *Dermatol Surg*, 2010; 36(8):1273-80. / T.M. Katz, A.S. Glaich, L.H. Goldberg [et al.] // *Dermatol Surg*. – 2010. – Vol. 36, N. 8. – P. 1273-80.
106. Kauzman A. Pigmented lesions of the oral cavity: review, differential diagnosis, and case presentations / A. Kauzman, M. Pavone, N. Blanas [et al.] // *J Can Dent Assoc*. – 2004. – Vol. 70, N. 10. – P. 682-683.
107. Kim B.J. Fractional photothermolysis for the treatment of striae distensae in Asian skin / B.J. Kim, D.H. Lee, M.N. Kim [et al.] // *Am J Clin Dermatol*. – 2008. – Vol. 9, N. 1. – P. 33-37.
108. Kim S. Clinical trial of a pinpoint irradiation technique with the CO₂ laser for the treatment of atrophic acne scars / S. Kim // *J Cosmet Laser Ther*. – 2008. – Vol. 10, N. 3. – P. 177-80.
109. Kono T. Prospective direct comparison study of fractional resurfacing using different fluences and densities for skin rejuvenation in Asians / T. Kono,

- H.H. Chan, G. W.F. [et al.] // *Lasers Surg. Med.* – 2007. – Vol. 39, N. 4. – P. 311-314.
110. Kositratna G. Effects of deviation from focal plane on lesion geometry for ablative fractional photothermolysis / G. Kositratna, M.L. Hibert, M. Jспан [et al.] // *Lasers Surg Med.* – 2016.
111. Kouba D.J. Nevus of Ota successfully treated by fractional photothermolysis using a fractionated 1440-nm Nd:YAG laser / D.J. Kouba, E.F. Fincher, R.L. Moy // *Arch Dermatol* –2008. – Vol. 144, N. 2. – P. 156-8.
112. Kumar S. Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts / S. Kumar, A.J. Millis, C. Baglioni // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1992. – Vol. 89, N. 10. – P. 4683– 4687.
113. Kumara S. Development in techniques for gingival depigmentation - An update / S. Kumara, S. Bhatb, M. Bhatc // *Indian Journal of Dentistry* –2012. – Vol. 3, N. 4. – P. 213-221.
114. Kuranov R.V. Combined application of optical methods to increase the information content of optical coherent tomography in diagnostics of neoplastic processes / R.V. Kuranov, V.V. Sapozhnikova, N.M. Shakhova [et al] // *Quantum Electronics.* – 2002. – Vol. 32, N. 11. – P. 993-998.
115. Kuranov R.V. Complementary use of cross-polarization and standard OCT for differential diagnosis of pathological tissues / R.V. Kuranov, V.V. Sapozhnikova, I.V. Turchin [et al] // *Optics Express.* – 2002. – Vol. 10, N. 15. – P. 707-713.
116. Kurkinen M. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue / M. Kurkinen, A. Vaheri, P.J. Roberts [et al.] // *Lab Invest* –1980. – Vol. 43, N. 1. – P. 47-51.
117. Laplante A.F. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing / A.F. Laplante, V. Moulin, F.A. Auger [et al.] // *J Histochem Cytochem.* – 1998. – Vol. 46, N. 11. – P. 1291-1301.

118. Laubach H. Effects of skin temperature on lesion size in fractional photothermolysis / H. Laubach, H.H. Chan, F. Rius [et al.] // *Lasers Surg Med.* – 2007. – Vol. 39, N. 1. – P. 14-18.
119. Laubach H.J. Skin responses to fractional photothermolysis / H.J. Laubach, Z. Tannous, R.R. Anderson [et al.] // *Lasers Surg Med.* – 2006. – Vol. 38, N. 2. – P. 142-149.
120. Lee C.K. Diagnosis of oral submucous fibrosis with optical coherence tomography / C.K. Lee, M.T. Tsai, H.C. Lee [et al.] // *J Biomed Opt.* – 2009. – Vol. 14, N. 5. – P. 054008.
121. Lee D.W. The Effectiveness of Ablative Fractional Carbon Dioxide Laser with Autologous Platelet Rich Plasma Combined Resurfacing for Hypertrophic Scar of the Shoulder / D.W. Lee, E.S. Park, M.S. Tak [et al.] // *Arch Aesthetic Plast Surg.* – 2016. – Vol. 22, N. 1. – P. 40-44.
122. Lee S.M. Adverse events of non-ablative fractional laser photothermolysis: a retrospective study of 856 treatments in 362 patients / S.M. Lee, M.S. Kim, Y.J. Kim [et al.] // *J Dermatolog Treat.* – 2014. – Vol. 25, N. 4. – P. 304-7.
123. Lin J.Y. A prospective, randomized controlled trial on the efficacy of fractional photothermolysis on scar remodeling / J.Y. Lin, W.C. Warger, L. Izikson [et al.] // *Lasers Surg Med.* – 2011. – Vol. 43, N. 4. – P. 265-272.
124. Lindhe J. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* – Blackwell Munksgaard, a Blackwell Publishing Company, 2003. – 1030 p.
125. Liu H. Laser induced collagen remodeling: a comparative study in vivo on mouse model / H. Liu, Y. Dang, Z. Wang [et al.] // *Lasers Surg Med.* – 2008. – Vol. 40, N. 1. – P. 13-19.
126. Lopez de Leon A. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections / A. Lopez de Leon, M. Rojkind // *J. Histochem Cytochem.* – 1985. – Vol. 33, N. 8. – P. 737-743.
127. Manstein D. Fractional photothermolysis: a new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury / D. Manstein, G.S.

- Herron, R.K. Sink [et al.] // *Lasers Surg Med.* – 2004. – Vol. 34, N. 5. – P. 426-38.
128. Manuskiatti W. Long-term effectiveness and side effects of carbon dioxide laser resurfacing for photoaged facial skin / W. Manuskiatti, R.E. Fitzpatrick, M.P. Goldman // *J Am Acad Dermatol.* – 1999. – Vol. 40, N. 3. – P. 401-11.
129. Martin P. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing / P. Martin, R. Nunan // *Br J Dermatol.* – 2015. – Vol. 173, N. 2. – P. 370-378.
130. Martinelli-Kläy C.P. Oral Malignant Melanoma Initially Misdiagnosed as a Racial Pigmentation: A Case Report / C.P. Martinelli-Kläy, M.L. Laporte, C.R. Martinelli [et al.] // *Dermatopathology.* – 2016. – Vol. 3, N. 1. – P. 1-7.
131. McKenzie A.L. Physics of thermal processes in laser-tissue interaction / A.L. McKenzie // *Phys Med Biol.* – 1990. – Vol. 35, N. 9. – P. 1175-1209.
132. Meleti M. Pigmented lesions of the oral mucosa and perioral tissues: a flow-chart for the diagnosis and some recommendations for the management. / M. Meleti, P. Vescovi, W.J. Mooi [et al.] // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* – 2008. – Vol. 105, N. 5. – P. 606-616.
133. Nanni C.A. Complications of carbon dioxide laser resurfacing. An evaluation of 500 patients / C.A. Nanni, T.S. Alster // *Dermatol Surg.* – 1998. – Vol. 24, N. 3. – P. 315-20.
134. Orringer J.S. Connective tissue remodeling induced by carbon dioxide laser resurfacing of photodamaged human skin / J.S. Orringer, S. Kang, T.M. Johnson [et al.] // *Arch Dermatol.* – 2004. – Vol. 140, N. 11. – P. 1326-1332.
135. Philipp C.M. Lasers in surgery / C.M. Philipp, M.A. Trelles // *Photonics & Lasers in Medicine.* – 2015. – Vol. 4, N. 3. – P. 207-209.
136. Preus H.R. A randomized, double-masked clinical trial comparing four periodontitis treatment strategies: 1-year clinical results. / H.R. Preus, T.M. Gunleiksrud, L. Sandvik [et al.] // *J Periodontol.* – 2013. – Vol. 84, N. 8. – P. 1075-1086.

137. Puchtler H. On the binding of direct cotton dyes by amyloid / H. Puchtler, F. Sweat, J.G. Kuhns // *J. Histochem Cytochem.* – 1964. – Vol. 12 –P. 900.
138. Rao G. Haemostatic effect of CO2 laser over excision of an intraoral hemangioma / G. Rao, P.S. Tripathi, K. Srinivasan // *International Journal of Laser Dentistry.* – 2012. – Vol. 2, N. 3. – P. 74-77.
139. Ravanti L. Matrix metalloproteinases in wound repair (review) / L. Ravanti, V.M. Kahari // *Int J Mol Med.* – 2000. – Vol. 6, N. 4. – P. 391-407.
140. Rerknimitr P. Non-ablative fractional photothermolysis in treatment of idiopathic guttate hypomelanosis. / P. Rerknimitr, S. Chitvanich, M. Pongprutthipan [et al.] // *J Eur Acad Dermatol Venereol.* – 2015. – Vol. 29, N. 11. – P. 2238-42.
141. Rinaldi F. Laser: a review / F. Rinaldi // *Clin Dermatol.* – 2008. – Vol. 26, N. 6. – P. 590-601.
142. Roberts T.L. Lasers, facelifting, and the future. / T.L. Roberts, J.N. Pozner // *Clin Plast Surg.* – 2000. – Vol. 27, N. 2. – P. 293-299.
143. Rosa D.S. Esthetic treatment of gingival melanin hyperpigmentation with Er:YAG laser: short-term clinical observations and patient follow-up / D.S. Rosa, A.C. Aranha, C.d.P. Eduardo [et al.] // *J Periodontol.* – 2007. – Vol. 78, N. 10. – P. 2018-2025.
144. Ross E.V. Intense pulsed light and laser treatment of facial telangiectasias and dyspigmentation: some theoretical and practical comparisons / E.V. Ross, M. Smirnov, M. Pankratov [et al.] // *Dermatol Surg.* – 2005. – Vol. 31, N. 9 Pt 2. – P. 1188 - 1198.
145. Sanjeevini H. Gingival de-pigmentation: 2 case reports. / H. Sanjeevini, Pudukalkatti P., B.G. Soumya [et al.] // *World Journal of Medical Pharmaceutical and Biological Sciences.* – 2012. – Vol. 2, N. 1. – P. 1-4.
146. Sattler E.C. Confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography for the evaluation of the kinetics and quantification of wound healing after fractional laser therapy / E.C. Sattler, K. Poloczek, R. Kästle [et al.] // *J Am Acad Dermatol.* – 2013. – Vol. 69, N. 4. – P. 165-173.

147. Schmitt J.M. Cross-polarized backscatter in optical coherence tomography of biological tissue / J.M. Schmitt, S.H. Xiang // *Opt Lett.* – 1998. – Vol. 23, N. 13. – P. 1060-1062.
148. Schmitt J.M. Optical Coherence Tomography (OCT): A Review / J.M. Schmitt // *IEEE Journal of selected topics in quantum electronic.* – 1999. – Vol. 5, N. 4. – P. 1205-1215.
149. Schoenewolf N.L. Laser treatment of solar lentigines on dorsum of hands: QS Ruby laser versus ablative CO2 fractional laser - a randomized controlled trial / N.L. Schoenewolf, J. Hafner, R. Dummer [et al.] // *Eur J Dermatol.* – 2015. – Vol. 25, N. 2. – P. 122-6.
150. Schwartz R.J. Long-term assessment of CO2 facial laser resurfacing: aesthetic results and complications / R.J. Schwartz, A.J. Burns, R.J. Rohrich [et al.] // *Plast Reconstr Surg.* – 1999. – Vol. 103, N. 2. – P. 592-601.
151. Shah D. Lasers in facial aesthetics- a review / D. Shah, N. Desai, R. Dhanak // *Advances in Human Biology.* – 2014. – Vol. 4, N. 3. – P. 1-6.
152. Sharon E. Vaporization of melanin in oral tissues and skin with a carbon dioxide laser: a canine study / E. Sharon, B. Azaz, M. Ulmansky // *J Oral Maxillofac Surg.* – 2000. – Vol. 58, N. 12. – P. 1387-1394.
153. Sherman J.A. Radiosurgery for gingival melanin depigmentation / J.A. Sherman, A. Gurkan, F. Arikan // *Dent Today.* – 2009. – Vol. 28, N. 1. – P. 111-120.
154. Smith M.H. Melanoma of the Oral Cavity: an Analysis of 46 New Cases with Emphasis on Clinical and Histopathologic Characteristics / M.H. Smith, I. Bhattacharyya, D.M. Cohen [et al.] // *Head Neck Pathol.* – 2016. – Vol. 10, N. 3. – P. 298-305.
155. Souil E. Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin / E. Souil, A. Capon, S. Mordon [et al.] // *Br J Dermatol.* – 2001. – Vol. 144, N. 2. – P. 260-266.

156. Sreeja C. Oral pigmentation: A review / C. Sreeja, K. Ramakrishnan, D. Vijayalakshmi [et al.] // *J Pharm Bioallied Sci.* – 2015. – Vol. 7, N. 2. – P. 403-408.
157. Stotland M. The safety and efficacy of fractional photothermolysis for the correction of striae distensae / M. Stotland, A.M. Chapas, L. Brightman [et al.] // *J Drugs Dermatol.* – 2008. – Vol. 7, N. 9. – P. 857-861.
158. Sweat F. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue / F. Sweat, H. Puchtler, S. Rosenthal // *Arch Pathol Lab Med.* – 1964. – Vol. 78. – P. 69-72.
159. Szpaderska A.M. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds / A.M. Szpaderska, J.D. Zuckerman, L.A. DiPietro // *J Dent Res.* – 2003. – Vol. 82. – P. 621-626.
160. Szpaderska A.M. Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds / A.M. Szpaderska, C.G. Walsh, M.J. Steinberg [et al.] // *J Dent Res.* – 2005. – Vol. 84, N. 4. – P. 309-314.
161. Tal H. A novel cryosurgical technique for gingival depigmentation / H. Tal // *J Am Acad Dermatol.* – 1991. – Vol. 24, N. 2. – P. 292-293.
162. Tanzi E.L. Comparison of a 1450-nm diode laser and a 1320-nm Nd:YAG laser in the treatment of atrophic facial scars: a prospective clinical and histologic study. / E.L. Tanzi, T.S. Alster // *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery.* – 2004. – Vol. 30, N. 2. – P. 152-157.
163. Taskiran D. Quantification of Total Collagen in Rabbit Tendon by the Sirius Red Method / D. Taskiran, E. Taskiran, H. Yercan [et al.] // *Tr J of Medical Sciences.* – 1999. – Vol. 29. – P. 7-9.
164. Taudorf E.H. Non-ablative fractional laser provides long-term improvement of mature burn scars--a randomized controlled trial with histological assessment / E.H. Taudorf, P.L. Danielsen, I.F. Paulsen [et al.] // *Lasers Surg Med.* – 2015. – Vol. 47, N. 2. – P. 141-7.

165. Tierney E.P. Review of fractional photothermolysis: treatment indications and efficacy / E.P. Tierney, D.J. Kouba, C.W. Hanke // *Dermatol Surg.* – 2009. – Vol. 35, N. 10. – P. 1445-61.
166. Tsai M-T. Monitoring of wound healing process of human skin after fractional laser treatments with optical coherence tomography / M.-T. Tsai, C.-H. Yang, S.-C. Shen [et al.] // *Biomed Opt Express.* – 2013. – Vol. 4, N. 11. – P. 2362-2375.
167. Tuchin V.V. Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis / V.V. Tuchin. – SPIE Press, 2007.
168. Vaalamo M. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds / M. Vaalamo, L. Mattila, N. Johansson [et al.] // *J Invest Dermatol.* – 1997. – Vol. 109, N. 1. – P. 96-101.
169. Vasily D.B. Treatment of melasma using the Starlux 1540 nm fractional handpiece / D.B. Vasily // *Lasers Surg Med.* – 2007. N. 19. – P. 23.
170. Walgrave S.E. Evaluation of a novel fractional resurfacing device for treatment of acne scarring / S.E. Walgrave, A.E. Ortiz, H.T. MacFalls [et al.] // *Lasers Surg Med.* – 2009. – Vol. 41, N. 2. – P. 122-7.
171. Wanitphakdeedecha R. The efficacy in melasma treatment using a 1410 nm fractional photothermolysis laser / R. Wanitphakdeedecha, N. Keoprasom, S. Eimpunth [et al.] // *J Eur Acad Dermatol Venereol.* – 2014. – Vol. 28, N. 3. – P. 293-7.
172. Wanner M. Fractional Photothermolysis: Treatment of Facial and Nonfacial Cutaneous Photodamage with a 1,550-nm Erbium-Doped Fiber Laser / M. Wanner, E.L. Tanzi, T.S. Alster // *Dermatol Surg.* – 2007. – Vol. 33. – P. 23-28.
173. Weinstein C. Carbon dioxide laser resurfacing. Long-term follow up in 2123 patients / C. Weinstein // *Clin Plast Surg.* – 1998. – Vol. 25, N. 1. – P. 109-30.

174. Wilmink G.J. Molecular imaging-assisted optimization of hsp70 expression during laser-induced thermal preconditioning for wound repair enhancement / G.J. Wilmink, S.R. Opalenik, J.T. Beckham [et al.] // *J Invest Dermatol.* – 2009. – Vol. 129, N. 1. – P. 205-216.
175. Xie S. Measurement of optical penetration depth and refractive index of human tissue / S. Xie, H. Li, B. Li // *Chinese Optics Letters.* – 2003. – Vol. 1, N. 1. – P. 44-46.
176. Yang Y. Treatment of Striae Distensae with Nonablative Fractional Laser versus Ablative CO2 Fractional Laser: A Randomized Controlled Trial / Y. Yang, G.-Y. Lee // *Ann Dermatol.* – 2011. – Vol. 23, N. 4. – P. 481-489.
177. Yousuf A. Removal of gingival melanin pigmentation with the semiconductor diode laser: a case report / A. Yousuf, M. Hossain, Y. Nakamura [et al.] // *J Clin Laser Med Surg.* – 2000. – Vol. 18, N. 5. – P. 263-266.