

На правах рукописи

**ТАРАКАНОВА**  
**Валентина Александровна**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
РЕГЕНЕРАЦИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ПРИ  
ПРИМЕНЕНИИ ДВУХВОЛНОВОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ  
ТЕРАПИИ**

3.1.7. Стоматология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой  
степени кандидата медицинских наук

Нижний Новгород – 2023

Работа выполнена на кафедре хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

*Дурново Евгения Александровна* – доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

*Тарасенко Светлана Викторовна* – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой хирургической стоматологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

*Чунихин Андрей Анатольевич* – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры хирургии полости рта ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.2.050.05 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8, тел. 8(812)3387104, e-mail: usovet@spb-gmu.ru) в зале заседания Ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России по адресу 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8 и на официальном сайте <https://www.1spbgmu.ru>).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук



**Кутукова Светлана Игоревна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Актуальным вопросом в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии является решение проблемы восстановления количественного и качественного состава утраченных тканей (Е.А. Дурново и др., 2010, 2018; С.В. Тарасенко и др., 2014, 2021, 2022; М.А. Амхадова и др., 2015, 2018; А.И. Грудянов и др., 2018; А.А. Чунихин и др., 2018, 2019, 2020; А.А. Долгалев и др., 2020). Важность его возрастает в аспекте пластической хирургии полости рта в связи с высокими требованиями к эстетике, функциональной целостности и гармоничности челюстно-лицевой области.

Особенности восстановления открытых раневых поверхностей в полости рта всегда ассоциированы с инфицированием (M. Velusic-Gobic et al., 2018) и травматизацией (D.S. Thoma et al., 2018), приводящим к сбою гистогенеза, повышенному риску образования рубцовых деформаций, изменяющих архитектуру и функциональное состояние тканей (J.L. Roh et al., 2017). Разработка и внедрение способов воздействия на базисные механизмы регенерации тканей, в том числе слизистой оболочки полости рта, способствует благоприятному течению раневого процесса и приводит к сокращению сроков реабилитации пациентов. Одними из приоритетных являются методы, основанные на достижениях фотохимии, фотобиологии и квантовой физики (С.В. Тарасенко и др., 2018, 2021, 2022; А.А. Чунихин и др., 2018, 2019, 2020; Д.А. Трунин, 2021).

Активное развитие в медицинской практике получил метод фотодинамической терапии. Он зарекомендовал себя эффективным противоопухолевым, антимикробным и противовоспалительным методом лечения (А.А. Чунихин 2015, 2017, 2022; А.В. Баранов и др., 2021; I.S. Mfoou-Tynga et al., 2021; С. Pérez et al., 2021). Фотодинамическая стимуляция регенерации применяется в реконструктивно – пластической и регенеративной медицине (О.С. Панова и др., 2021; M. Mogensen et al., 2022), для стимуляции процессов заживления в кожных покровах (Г.М. Исмаилов, 2017; М.А. Shakhova et al., 2018; J. Oyama et al., 2020).

В последнее время предприняты попытки изучения эффектов, возникающих в тканях раневой поверхности слизистой оболочки полости рта при фотодинамическом воздействии (P. Deyhimi et al., 2016; M. Motamedifar et al., 2021; A. Andisheh-Tadbir et al., 2021). Эти работы единичны, нет четкого понимания процессов, протекающих в тканях при фотодинамическом воздействии, не обоснованы преимущества и недостатки влияния различных режимов светового воздействия на регенерацию слизистой оболочки полости рта, что определяет необходимость проведения дальнейших исследований.

### Степень разработанности темы исследования

В настоящее время в реконструктивно – пластической и регенеративной медицине успешно применяется фотодинамическая стимуляция регенерации (Г.М. Исмаилов, 2017; М.А. Shakhova et al., 2018; Панова О. С. и др., 2021; J. Oyama et al., 2020; Mogensen M. et al., 2022). Известны единичные работы по

изучению влияния фотодинамической терапии на регенерацию слизистой оболочки полости рта *in vivo* (P. Deyhimi et al., 2016; M. Motamedifar et al., 2021; A. Andisheh-Tadbir et al., 2021).

Практическим обоснованием для выполнения исследования является выбор эффективного режима фотодинамического воздействия на регенерацию слизистой оболочки полости рта с дальнейшей разработкой нового способа активации регенерации тканей раневой поверхности с использованием метода фотодинамической терапии.

### **Цель исследования**

Экспериментально-клиническое исследование влияния двухволновой фотодинамической терапии на регенерацию слизистой оболочки полости рта.

### **Задачи исследования**

1. Изучить влияние фотодинамического воздействия с использованием излучений на длинах волн 660 нм и 400 нм с различными характеристиками на ткани раневой поверхности на основании созданных моделей дефекта слизистой оболочки полости рта у животных и определить наиболее оптимальные параметры светового излучения в эксперименте.

2. На модели дефекта слизистой оболочки полости рта у лабораторных животных изучить особенности течения раневого процесса при фотодинамическом воздействии с установленными оптимальными параметрами на основании оценки клинических признаков, морфологических изменений тканей, результатов морфометрического и иммуногистохимического методов исследования; анализа функционального состояния микроциркуляторного русла тканей.

3. Экспериментально оценить состояние окислительно-восстановительного потенциала, накопление молекулярных продуктов свободнорадикального окисления и состояние местной антиоксидантной системы защиты в гомогенатах ткани раневой поверхности слизистой оболочки полости рта при фотодинамическом воздействии с определенными оптимальными параметрами.

4. Провести сравнительный анализ клинической эффективности применения традиционного метода ведения раневой поверхности и с использованием разработанного режима фотодинамического воздействия на хирургическом этапе комплексного лечения на основании оценки особенностей течения раневого процесса и состояния про-антиоксидантного баланса в полости рта у пациентов.

5. Разработать и внедрить в практическое здравоохранение способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта после хирургических вмешательств с использованием метода фотодинамической терапии.

### **Научная новизна исследования**

Впервые изучено влияние фотодинамического воздействия с использованием излучений на длинах волн 660 нм и 400 нм с различными характеристиками на ткани раневой поверхности на основании созданных моделей дефекта слизистой оболочки полости рта у лабораторных животных и

определены наиболее оптимальные параметры светового воздействия: последовательное комбинированное двухволновое излучение на длинах волн 660 нм и 400 нм с суммарной плотностью энергии 15 Дж/см<sup>2</sup> и плотностью мощности 0,2 Вт/см<sup>2</sup> и 0,1 Вт/см<sup>2</sup>, соответственно.

Впервые в эксперименте изучены особенности течения раневого процесса на слизистой оболочке полости рта на основании оценки клинических признаков и морфологических изменений, результатов морфометрического и иммуногистохимического методов исследования, анализа функционального состояния микроциркуляторного русла тканей раневой поверхности при однократном фотодинамическом воздействии с установленными параметрами светового излучения, производимом в первые послеоперационные сутки.

Впервые проведена оценка окислительно-восстановительного потенциала, накопления молекулярных продуктов свободнорадикального окисления и состояния местной антиоксидантной системы защиты в гомогенатах ткани раневой поверхности слизистой оболочки полости рта при однократном фотодинамическом воздействии с установленными параметрами светового излучения, производимом в первые послеоперационные сутки.

Впервые разработан и предложен новый способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта с использованием метода фотодинамической терапии после хирургических вмешательств у пациентов в реабилитационном периоде (патент РФ № 2775939 С1).

Впервые на основании оценки особенностей течения раневого процесса и состояния про-антиоксидантного баланса в полости рта у пациентов проведен сравнительный анализ клинической эффективности применения традиционного метода ведения раневой поверхности и с использованием разработанного нами способа на хирургическом этапе комплексного лечения.

Впервые внедрен в практическое здравоохранение способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта с использованием метода фотодинамической терапии.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В эксперименте предложены и обоснованы оптимальные параметры светового излучения, используемые при фотодинамическом воздействии на ткани раневой поверхности слизистой оболочки полости рта. На основании анализа данных морфологического, морфометрического, иммуногистохимического и биохимического методов исследования, функционального состояния микроциркуляторного русла изучена динамика течения раневого процесса.

Практической стоматологии предложен новый способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта (патент РФ № 2775939 С1). Изучена и клинически обоснована эффективность применения разработанного способа при ведении открытых раневых поверхностей по сравнению с традиционным методом.

## **Методология и методы исследования**

Экспериментальное исследование выполнено на 189 животных и включало два предэксперимента и эксперимент. В предэкспериментах установлены оптимальные параметры светового излучения.

В эксперименте на основании анализа данных морфологического, морфометрического, иммуногистохимического и биохимического исследования, лазерной доплеровской флоуметрии доказана эффективность применения однократного фотодинамического воздействия с предложенными оптимальными параметрами излучения в ведении раневой поверхности слизистой оболочки полости рта.

Клинический раздел включал обследование и лечение 26 человек, которым выполнялся забор свободного десневого трансплантата с твердого неба. В послеоперационном периоде ведение открытой раневой поверхности на твердом небе проведено с использованием традиционной техники (группа сравнения 1) и разработанным способом активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта (основная группа 2). Изучены выраженность признаков клинических проявлений течения раневого процесса и интенсивность окислительно-восстановительных процессов в полости рта у пациентов в раннем послеоперационном периоде.

### **Основные положения, выносимые в защиту**

1. Однократное фотодинамическое воздействие последовательного комбинированного светового излучения на длинах волн 660 нм и 400 нм с суммарной плотностью энергии 15 Дж/см<sup>2</sup> и плотностью мощности 0,2 Вт/см<sup>2</sup> и 0,1 Вт/см<sup>2</sup>, соответственно, производимое в первые послеоперационные сутки, стимулирует регенераторные процессы в поврежденных тканях у животных за счет повышения пролиферативной активности клеток, стимуляции процесса ангиогенеза, отсутствия повышенного коллагенообразования, положительного влияния на состояние микроциркуляторного русла, что в совокупности обуславливает сокращение сроков замещения дефекта аутентичными тканями с полным восстановлением их архитектоники.

2. При использовании последовательного комбинированного светового излучения на длинах волн 660 нм и 400 нм с суммарной плотностью энергии 15 Дж/см<sup>2</sup> и плотностью мощности 0,2 Вт/см<sup>2</sup> и 0,1 Вт/см<sup>2</sup>, соответственно, при однократном фотодинамическом воздействии, производимом в первые послеоперационные сутки, в тканях раневой поверхности слизистой оболочки полости рта не происходит нарушения про-антиоксидантного баланса, что отражается в снижении интенсивности свободнорадикальных реакций на фоне повышенного функционирования местной антиоксидантной системы защиты в гомогенатах тканей у животных, и подтверждает безопасность и низкую инвазивность при использовании предлагаемой методики.

3. Применение в первые послеоперационные сутки фотодинамической терапии с использованием последовательного комбинированного светового излучения на длинах волн 660 нм и 400 нм с суммарной плотностью энергии 15 Дж/см<sup>2</sup> и плотностью мощности 0,2 Вт/см<sup>2</sup> и 0,1 Вт/см<sup>2</sup>, соответственно, благоприятно влияет на течение раневого процесса слизистой оболочки полости

рта в послеоперационном периоде, что подтверждается анализом клинических данных и результатов исследования интенсивности свободнорадикального окисления, уровней молекулярных продуктов перекисного окисления липидов полости рта и доказывает высокую эффективность предлагаемого способа перед традиционным методом ведения ран.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследования**

Достоверность полученных результатов определяется большой выборкой данных экспериментального исследования, подтвержденного микрофотографиями препаратов и данными лабораторных исследований, а также достаточным количеством клинических наблюдений и статистической обработкой полученных результатов. Научные положения, выводы и рекомендации подкреплены фактическими данными.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта внедрен в лечебную практику Стоматологической поликлиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России; поликлиники № 2 стоматологической ФБУЗ «ПОМЦ» ФМБА России; стоматологического отделения ООО «ММЦ «Волготрангаз». Материалы и результаты исследования включены в план лекций и практических занятий кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

### **Апробация работы**

Основные положения диссертационной работы изложены и обсуждены на: VIII Всероссийском конгрессе с международным участием «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2019); Всероссийской конференции Volgamedscience, посвященной 100-летию ПИМУ (Нижний Новгород, 2020); XI Международном конгрессе «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2020); Международной научно-практической конференции «Лазеры в медицине и биологии» (Самарканд, 2021); Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы оториноларингологии, посвященной 100-летию кафедры болезней уха, горла и носа Приволжского исследовательского медицинского университета» (Нижний Новгород, 2022); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы челюстно-лицевой хирургии и стоматологии, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В. А. Малышева» (Санкт-Петербург, 2022).

### **Публикации**

По материалам научно-исследовательской работы опубликовано 8 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых центральных научных изданиях, рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов диссертаций (1 из них входит в международную реферативную базу данных и систему цитирования Scopus), получен 1 патент РФ на изобретение.

### **Личный вклад автора в проведенное исследование**

Автором выполнен анализ научной информации. На 189 животных при участии автора проведено изучение влияния фотодинамического воздействия на течение раневого процесса слизистой оболочки полости рта, разработан и

внедрен в практику способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта. Проведены лечение и обследование 26 пациентов, у 13 из которых ведение раневой поверхности на слизистой оболочке твердого неба осуществлялось с использованием разработанного способа, статистическая обработка данных. Автор принимал активное участие в подготовке публикаций, выступал с результатами исследований на конференциях всероссийского и международного уровней.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация содержит 271 машинописную страницу. Состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 417 наименований работ, из них 196 отечественных и 221 зарубежный автор. Работа иллюстрирована 59 рисунками, 38 таблицами и 11 формулами, запланирована и выполнена на кафедре хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы**

Экспериментальный этап состоял из двух предэкспериментов и эксперимента. В работе использовались 189 половозрелых аутбредных особей крыс стока линии Wistar, самки массой тела 200-300 г. На слизистую оболочку щеки животных наносили круглые дефекты диаметром 3 мм с помощью устройства для биопсии «EPITHEASY» («Medax S.r.l.», Италия) (рисунок 1). Раны заживали вторичным натяжением. В первые послеоперационные сутки после нанесения фотосенсибилизатора «Гелеофор» (ООО «Лазер-Медцентр», Россия) на раневую поверхность на 30 минут проводилось однократное фотодинамическое воздействие с использованием аппарата фотодинамического светодиодного АФС «Гармония» (ООО «Лазер-Медцентр», Россия).

В зависимости от используемой длины волны животные в предэкспериментах были разделены на 3 группы, каждая из которых подразделялась на подгруппы а, б и с в соответствии со значениями плотности энергии. В группе 1 использовано излучение с длиной волны 400 нм, плотностью мощности  $0,1 \text{ Вт/см}^2$ , в группе 2 – с длиной волны 660 нм, плотностью мощности  $0,2 \text{ Вт/см}^2$  и в группе 3 – с длинами волн 660 нм и 400 нм, плотностью мощности  $0,2 \text{ Вт/см}^2$  и  $0,1 \text{ Вт/см}^2$ , соответственно. Подгруппам а, б и с соответствовали плотности энергии излучения: № 1 – 25, 50 и  $75 \text{ Дж/см}^2$  и № 2 – 10, 15 и  $20 \text{ Дж/см}^2$ . Время светового воздействия рассчитывали согласно соотношению плотности энергии к плотности мощности. Повторное хирургическое проводилось на 3, 7 и 14 сутки. Биоптаты тканей отправляли в лабораторию для проведения биохимического и гистологического исследования (рисунок 2).



Рисунок 1 - Модель раневой поверхности



Рисунок 2 - Биоптат ткани

В эксперименте сформированы контрольная (n=54) и экспериментальная (n=54) группы животных. В экспериментальной группе, в отличие от контрольной, в первые послеоперационные сутки на ткани раневой поверхности проводилось однократное фотодинамическое воздействие последовательного комбинированного двухволнового излучения. Параметры светового воздействия выбраны на основании результатов предэкспериментов и представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры используемых излучений

Длина волны, нм	Плотность энергии, Дж/см <sup>2</sup>	Плотность мощности, Вт/см <sup>2</sup>	Продолжительность воздействия, с
660 нм	7,5 Дж/см <sup>2</sup>	0,2 Вт/см <sup>2</sup>	37-38 с
400 нм	7,5 Дж/см <sup>2</sup>	0,1 Вт/см <sup>2</sup>	75 с

Перед оперативным вмешательством, на 3, 7 и 14 сутки проведено фотодокументирование с использованием цифрового фотоаппарата Canon EOS 50D (Япония), измерение раневой поверхности с помощью одностороннего периодонтального зонда (рисунок 3) и регистрация функционального состояния микроциркуляторного русла анализатором лазерным микроциркуляции крови компьютеризированным «ЛАКК-02» (НПП «Лазма», Россия). Оценивались показатели микроциркуляции и шунтирования (ПМ и ПШ), активные (миогенный и нейрогенный тонус (МТ и НТ), эндотелиально-зависимый компонента тонуса (ЭЗКТ)) и пассивные факторы контроля микроциркуляции (сердечный и дыхательный компоненты (СсК и ДхК)).

Повторное хирургическое вмешательство выполняли на 3, 7 и 14 сутки. Макропрепараты отправляли в лабораторию для гистологического и биохимического исследования. Выведение животных осуществлялось после всех манипуляций в реперные сроки.



Рисунок 3 – Измерение раневой поверхности

*Гистологические методы исследования.* Проведено изучение срезов препаратов тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта, окрашенных гематоксилин-эозином и методом по Массону с анилиновым синим (набор «БиоВитрум», Россия), выполнен морфометрический анализ площади, занимаемой коллагеновыми волокнами. Для определения пролиферативной активности и количества сосудов проводили иммуногистохимическое исследование с использованием антител к Ki-67 (клон MIB1, Dako, Дания) и CD 31 (EPR 127259, Abcam, США) (К.А. Колесник, 2019; А.Д. Коняева, 2021).

*Биохимические методы исследования.* Проведен анализ динамики показателей индуцированной биохемилюминесценции (индексы I<sub>max</sub> и S, показатель Z), определены степень окислительных модификаций белков, содержание молекулярных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) - диеновых и триеновых конъюгатов (ДК и ТК), малонового диальдегида, оснований Шиффа (ОШ) – и коэффициент Ко, активность ферментов антиоксидантной системы защиты (АОСЗ) (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза) в гомогенатах тканей (Е.А. Дурново, 2003, 2007; И.П. Иванова, 2014).

Клинический этап основан на результатах анализа обследования и лечения 26 человек (19 женщин и 7 мужчин) в возрасте от 18 до 64 лет. Оперативное вмешательство проводилось по поводу увеличения зоны кератинизированной десны и углубления преддверия полости рта, устранения и профилактики рецессий десны. Критерии не включения: возраст пациентов до 18 лет, беременность, наличие инвалидности и психических отклонений, злоупотребление курением и алкоголем, неудовлетворительный уровень гигиены полости рта, воспалительные заболевания пародонта, декомпенсированная сопутствующая патология, верифицированный диагноз ВИЧ-инфекции, онкологические заболевания.

Всем пациентам выполнялся забор свободного десневого трансплантата с твердого неба, в результате чего образовывались открытые раневые поверхности, которые в послеоперационном периоде в группе сравнения 1 (13 человек) велись с использованием традиционной техники (рана заживала открытым способом) и в основной группе 2 (13 человек) – разработанного способа активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта с использованием метода фотодинамической терапии (патент РФ № 2775939 С1) по утвержденному ранее протоколу.

*Изучение динамики клинического течения* процессов восстановления тканей донорской области в послеоперационном периоде проводилось по разработанной балльной системе оценки клинических параметров. Анкетированием, с учетом субъективных болевых ощущений пациента, была изучена выраженность болевого синдрома по шкале от 1 до 10 [А.М. Гуторова, 2020], наличие отека и гиперемии, кровоточивости раневой поверхности, размер послеоперационного дефекта. Полученные результаты в баллах регистрировались на 3, 7, и 14 сутки. В эти же сроки проведено *биохимическое исследование* субстрата ротовой жидкости. Определены параметры

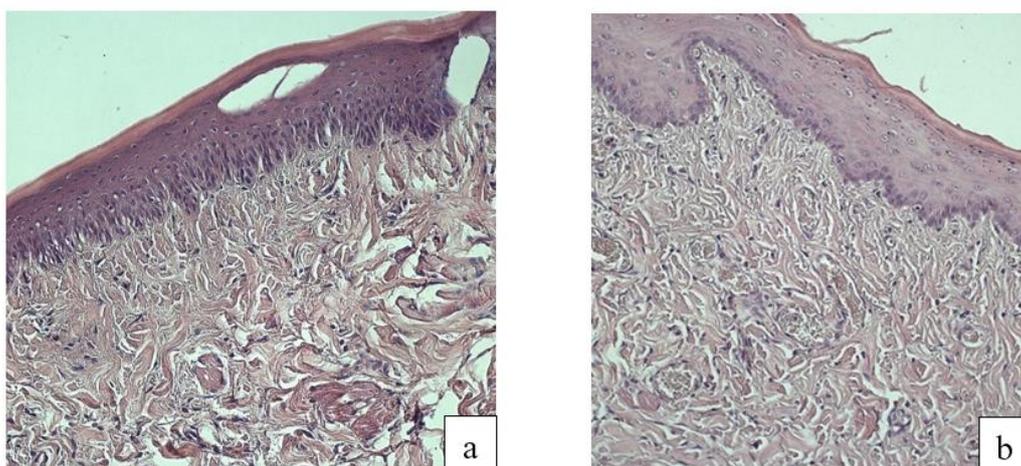
индуцированной биохемилюминесценции и содержание молекулярных продуктов ПОЛ и коэффициент Ко.

*Статистическая обработка результатов исследования* проводилась пакетом прикладных программ SPSS Statistics (Version 26), а также с помощью программы Microsoft Excel 2019 с использованием методов описательной статистики и сравнения зависимых и независимых групп. Для сравнения данных использовали t-критерий Стьюдента и непараметрические критерии.

### Результаты собственного исследования

Цель проведения предэкспериментов заключалась в определении безопасных параметров светового излучения, оказывающих благоприятное влияние на ткани раневой поверхности слизистой оболочки полости рта при проведении фотодинамического воздействия.

В предэксперименте № 1 изучено состояние про-антиоксидантного баланса на 3 сутки. Повышение плотности энергии излучения коррелировало с увеличением индекса I<sub>max</sub> и уменьшением показателя Z в гомогенатах тканей. В связи с чем установлено, что двухволновое излучение с суммарной плотностью энергии 25 Дж/см<sup>2</sup> является наиболее безопасным, что требует дальнейшего изучения характера изменения тканей раневой поверхности при фотодинамическом воздействии с использованием плотности энергии излучения менее 25 Дж/см<sup>2</sup>. При микроскопическом анализе препаратов тканей в зоне созданного дефекта в подслизистом слое на 14 сутки определялись рубцовые изменения в 1 и 2 группах и подгруппах 3а и 3с (рисунок 4). В подгруппе 3б строение ткани соответствовало структуре многослойного плоского ороговевающего эпителия. Таким образом, для проведения эксперимента предложено фотодинамическое воздействие двухволнового излучения с суммарной плотностью энергии 15 Дж/см<sup>2</sup>.



а – в подгруппе 3а; б – в подгруппе 3с

Рисунок 4 – Микрофотографии слизистой оболочки щеки животных на 14 сутки

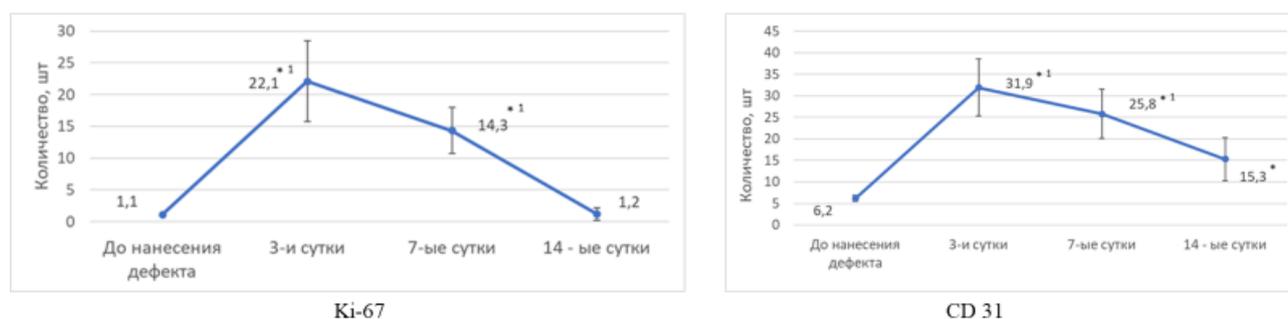
Экспериментальные данные макроскопического исследования согласовывались с микроскопической картиной тканей раневой поверхности. На 3 сутки в эпителии слизистой оболочки экспериментальной группы преобладали митотически активные клетки, формировался шиповатый слой и сосочки собственной пластинки слизистой оболочки, что свидетельствовало о активном течении пролиферативных процессов (рисунок 5).



1 – митотически активные клетки;  
2 – сосочки собственной пластинки слизистой оболочки

Рисунок 5 – Микрофотография слизистой оболочки щеки экспериментальной группы животных на 3 сутки

На основании работ К.А. Колесника и А.Д. Коняевой (2019, 2021) для определения пролиферативной активности клеток и количества сосудов использованы маркеры Ki-67 и CD 31. Высокий уровень экспрессии Ki-67 на 3 сутки указывал на пик пролиферативной активности клеток, сопровождающийся ростом числа сосудов на основании повышенной экспрессии CD 31 (рисунок 6). Такие же результаты получили М. Motamedifar и А. Andisheh-Tabir с соавторами (2021). Стоит отметить, что увеличение числа сосудов в тканях контрольной группы животных на 14 сутки (таблица 2) по данным M.S. Wietecha и P.H. Wang (2013, 2018) связано с высоким риском образования рубцовой ткани.



\* статистически значимые различия относительно значения до нанесения дефекта, <sup>1</sup> статистически значимые различия относительно значения на 14 сутки исследования ( $p \leq 0,008$  в перерасчете на множественные сравнения)

Рисунок 6 – Динамика экспрессии антител в экспериментальной группе

Таблица 2 - Экспрессия CD 31 в группах животных, шт

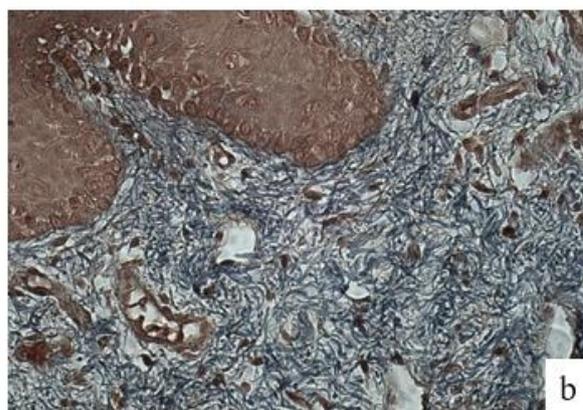
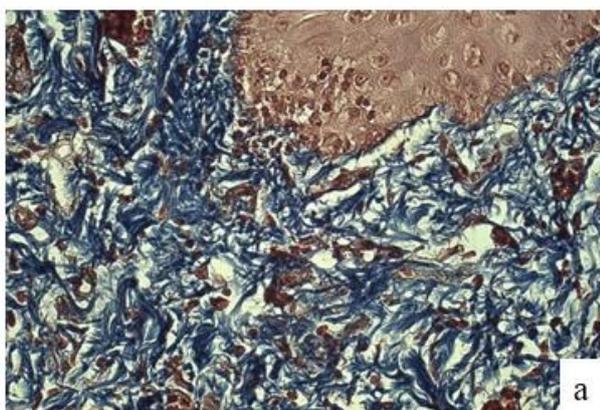
День эксперимента	Контрольная группа	Экспериментальная группа
До нанесения дефекта		6,2±0,75
3 сутки	21,7±8,19* <sup>1</sup>	31,9±6,60* <sup>1a</sup>
7 сутки	23,5±5,79* <sup>1</sup>	25,8±5,70* <sup>1</sup>
14 сутки	33,9±4,37 *	15,3±5,02* <sup>a</sup>

\* статистически значимые различия относительно значения до нанесения дефекта ( $p \leq 0,008$  в перерасчете на множественные сравнения).

<sup>1</sup> статистически значимые различия относительно значения на 14 сутки исследования ( $p \leq 0,008$  в перерасчете на множественные сравнения).

<sup>a</sup> статистически значимые различия относительно аналогичного значения в контрольной группе ( $p \leq 0,05$ ).

Фотодинамическое воздействие способствовало восстановлению качественного состава новообразованных тканей к 14 суткам, что отражалось в снижении числа фибробластов, образовании ориентированных в своем расположении волокон одинаковой толщины, что видно по их равномерному распределению параллельно базальной мембране и структурированной сети в подслизистой основе (рисунок 7). Морфометрический анализ показал уменьшение в срезах тканей площади, занимаемой коллагеновыми волокнами (таблица 3). В контрольной группе хаотично ориентированные грубые волокна формировали участки разрастания соединительной ткани, которые занимали большую исходных размеров площадь.



А – контрольная группа; б – экспериментальная группа

Рисунок 7 – Микрофотографии препаратов слизистой оболочки щеки животных на 14 сутки

Таблица 3 – Значение площади среза, занятой коллагеновыми волокнами,  $\text{MKM}^2$

День эксперимента	Контрольная группа	Экспериментальная группа
До нанесения дефекта	33861±7977,1	
3-и сутки	30719±3251,9	24136,8±7752,61 <sup>a</sup>
7-ые сутки	28293±7122,2	26602±3635,45
14-ые сутки	36126±10520,3	19708,16±6336,4 <sup>*a</sup>

\* статистически значимые различия относительно значения до нанесения дефекта ( $p \leq 0,008$  в перерасчете на множественные сравнения).

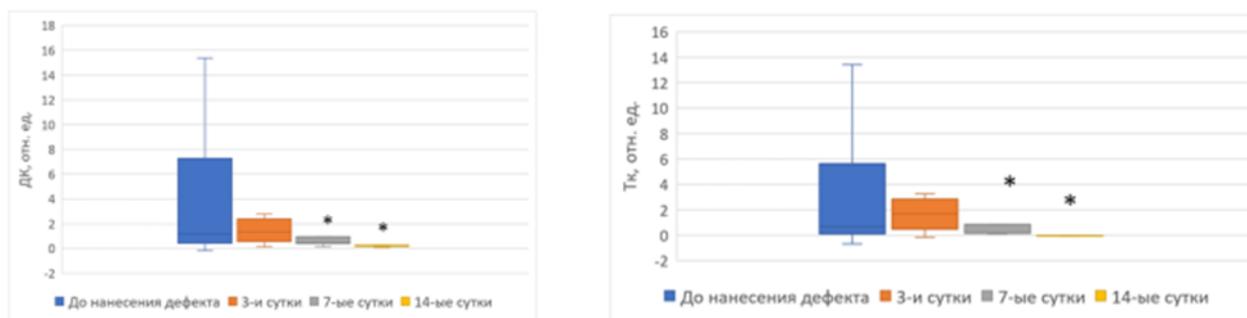
<sup>a</sup> статистически значимые различия относительно аналогичного значения в контрольной группе ( $p \leq 0,05$ ).

Следующий этап исследования посвящен изучению свободнорадикального окисления (СРО) в динамике раневого процесса в связи с цитотоксическим эффектом фотодинамического воздействия, опосредованного генерацией активных форм кислорода (D. Straten et al., 2017). На 7 сутки потенциальная способность тканей к СРО снижалась, что подтверждалось уменьшением индексов  $I_{\text{max}}$  и  $S$  (рисунок 8) и низким уровнем продуктов ПОЛ на 7 и 14 сутки (рисунок 9, таблица 4). Новообразованные структуры не подвергались окислительному повреждению в результате низкой интенсивности процессов СРО, поддерживаемой работой АОСЗ, выражающейся в постепенном возрастании параметра  $Z$  и высокой активности ферментов, что свидетельствовало о безопасности проведения фотодинамического воздействия по разработанному нами протоколу.



\* статистически значимые различия относительно значения до нанесения дефекта, ( $p \leq 0,008$  в перерасчете на множественные сравнения)

Рисунок 8 - Динамика изменения значения индексов  $I_{\text{max}}$  и  $S$  в экспериментальной группе



\* статистически значимые различия по сравнению с исходным уровнем ( $p \leq 0,008$  в перерасчете на множественные сравнения)

Рисунок 9 - Динамика изменения уровней первичных продуктов ПОЛ в экспериментальной группе

Таблица 4 – Уровни ОШ в группах животных

Показатель	День эксперимента	Группы животных	
		контрольная группа 1	экспериментальная группа 2
ОШ (отн. ед.)	до нанесения дефекта	165,73 [67,91;1100,5]	
	3 сутки	8,71 [26,28;1257,71]	520,14 [61,99;919,77]
	7 сутки	681,87 [355,26;846,76]	38,62 [23,58;267,75]*
	14 сутки	176,54 [136;187,58]	26,65 [23,1;47,06]* <sup>a</sup>
* статистически значимые различия по сравнению с исходным уровнем ( $p \leq 0,008$ в перерасчете на множественные сравнения).			
<sup>a</sup> статистически значимые различия по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ).			

Важное значение в трофической поддержке активно протекающих регенераторных процессов играет функциональное состояние микроциркуляторного русла. На 7 сутки в экспериментальной группе повышался ПМ (таблица 5), что указывало на увеличение уровня перфузии объема тканей раневой поверхности при фотодинамическом воздействии и способствовало снижению ПШ до значения близкого к исходному. Полученные результаты согласуются с полученными П.В. Перетягиным с соавторами (2015) данными. Однако, А.К. Мартусевич с соавторами (2015) связывают данное явление с увеличением концентрации активных форм кислорода, чего нами установлено не было.

Фотодинамическое воздействие оказывало положительное влияние на восстановление отдельных звеньев и систем регуляции микрососудистого русла. На 3 сутки оно способствовало снижению роли МТ с повышением ЭЗКТ и НТ, что указывало на усиление роли шунтирования в обеспечении микрокровотока. Увеличение МТ на фоне снижения НТ на 14 сутки свидетельствовало о уменьшении сопротивления стенок сосудов и возможном повышении кровотока

по артериоло-венулярному шунту. Высокие показатели ДхК и СсК определяли полное восстановление регуляции венозного возврата крови.

Таблица 5 – Значение ПМ в группах животных

Показатель	День эксперимента	Группы животных	
		контрольная группа 1	экспериментальная группа 2
ПМ (пф. ед.)	до нанесения дефекта	15,60 [14,62;16,8]	
	3 сутки	10,2 [8,4;11,6]	12,55 [11,6;12,8]
	7 сутки	15,28 [13,21;16,14]	17,71 [16,71;20,26] <sup>2a</sup>
	14 сутки	15,51 [13,2;19,37]	15,3 [14,92;15,6]
<sup>2</sup> статистически значимо относительно значения на 3-и сутки исследования внутри группы ( $p \leq 0,008$ в перерасчете на множественные сравнения). <sup>a</sup> статистически значимые различия относительно аналогичного значения в контрольной группе ( $p \leq 0,05$ ).			

Таким образом в эксперименте доказано, что при использовании фотодинамического воздействия по предложенному нами протоколу в тканях раневой поверхности слизистой оболочки полости рта не происходило нарушения про-антиоксидантного баланса, что подтверждало безопасность его применения в отношении активации и поддержания высокого уровня функционирования регенераторных процессов, улучшения микроциркуляции в тканях. На основании чего разработан новый способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта (патент РФ № 2775939 С1).

Сравнительное изучение особенностей течения раневого процесса в полости рта у пациентов с использованием данного способа проведено на основании анализа клинических данных и результатов биохимического исследования ротовой жидкости при проведении дополнительного хирургического вмешательства на слизистой оболочке твердого неба в послеоперационном периоде.

Признаки клинических проявлений в области раневой поверхности были выражены сильнее у пациентов в группе сравнения. При опросе пациентов основной группы не отмечалось интенсивного болевого синдрома. При осмотре отсутствовала кровоточивость раневой поверхности, у 7 пациентов (54±14%) не было отека в течение всего послеоперационного периода, у 6 пациентов (46±14%) наблюдалась полная эпителизация раневых поверхностей к 14 суткам.

Активность воспалительных реакций в полости рта характеризует про-антиоксидантный дисбаланс. В раннем послеоперационном периоде в ротовой жидкости пациентов основной группы отмечалось снижение индекса I<sub>max</sub> и S от физиологической нормы, что свидетельствовало о низкой интенсивности процессов СРО, протекающих на фоне возрастания параметра Z,

характеризующего активность АОСЗ. В свою очередь, уровни молекулярных продуктов ПОЛ соответствовали изменению параметров хемилуминограммы.

Таким образом, предлагаемый способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта (патент РФ № 2775939 С1) эффективен перед традиционным методом ведения ран. Он может быть рекомендован к применению в послеоперационном периоде у пациентов и внедрен в практическое здравоохранение.

## ВЫВОДЫ

1. На основании анализа результатов гистологического и биохимического исследования биоптатов и гомогенатов тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта экспериментальных животных определены наиболее оптимальные параметры светового излучения, а именно последовательное комбинированное двухволновое излучение на длинах волн 660 нм и 400 нм с суммарной плотностью энергии 15 Дж/см<sup>2</sup> и плотностью мощности 0,2 Вт/см<sup>2</sup> и 0,1 Вт/см<sup>2</sup>, соответственно.

2. В эксперименте доказано, что при однократном фотодинамическом воздействии с предложенными оптимальными параметрами светового излучения, производимом в первые послеоперационные сутки, отмечена следующая морфологическая динамика: макроскопически эпителизация раневых дефектов полностью завершена на 7 сутки; к 14 суткам – морфологическая структура новообразованной ткани соответствовала интактной. В контрольной группе визуализировались недифференцированные клетки, что свидетельствовало о незавершенности регенераторных процессов.

3. На основании анализа результатов иммуногистохимического исследования в эксперименте установлено повышение пролиферативной активности клеток и интенсивности ангиогенеза на 3 сутки при однократном фотодинамическом воздействии с предложенными оптимальными параметрами светового излучения, производимом в первые послеоперационные сутки, что отражалось в увеличении экспрессии маркеров Ki-67 и CD 31 до максимальных значений; на 14 сутки зафиксировано образование одинаковых по толщине, равномерно распределенных параллельно базальной мембране коллагеновых волокон и сокращение размеров занимаемой ими площади ткани. В контрольной группе отмечены преимущественно грубые и хаотично ориентированные фибриллы, формирующие участки разрастания соединительной ткани.

4. Экспериментальный анализ функционального состояния микроциркуляторного русла в области раневой поверхности слизистой оболочки полости рта выявил увеличение уровня перфузии объема тканей на 7 сутки, отсутствие застойно – ишемических явлений и нормализации микрокровотока в результате действия активных и пассивных факторов контроля микроциркуляции при однократном фотодинамическом воздействии с предложенными оптимальными параметрами светового излучения, производимом на первые послеоперационные сутки, в отличие от контрольной группы животных, где наблюдалась отрицательная динамика.

5. В гомогенатах тканей экспериментальных животных после фотодинамического воздействия происходит снижение потенциальной способности к свободнорадикальному окислению, уменьшение содержания молекулярных продуктов перекисного окисления липидов на 7 и 14 сутки, в то время как в контрольной группе процессы свободнорадикального окисления находились на высоком уровне функционирования.

6. Фотодинамическое воздействие с предложенными оптимальными параметрами светового излучения способствует постепенному повышению эффективности работы общей антиоксидантной системы защиты выше физиологической нормы в гомогенатах тканей животных, сопровождающееся высокой активностью ферментативного звена, что выражалось в увеличении параметра  $Z$  хемиллюминограммы на 14 сутки и значений активности супероксиддимутазы, каталазы и глутатионредуктазы во все реперные сроки исследования относительно контрольной группы животных, где отмечена обратная динамика.

7. Разработанный способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта обеспечивает благоприятное течение послеоперационного периода, о чем свидетельствуют низкая интенсивность клинических признаков; ускорение восстановления тканей раневой поверхности на фоне отсутствия нарушений про-антиоксидантного баланса в полости рта.

8. В практическое здравоохранение внедрен способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта после хирургических вмешательств с использованием метода фотодинамической терапии.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта показан к использованию в послеоперационном периоде у пациентов при ведении открытых раневых поверхностей с использованием метода фотодинамической терапии в совокупности с фотосенсибилизатором хлоринового ряда «Гелеофор» с целью восстановления аутентичных тканей в области оперативного вмешательства.

2. Проведение фотодинамической терапии осуществляется с использованием последовательного воздействия излучения сверхъярких полупроводниковых светодиодов в течение 37-38 секунд при длине волны 660 нм плотностью мощности  $0,2 \text{ Вт/см}^2$ , затем в течение в течение 75 секунд при длине волны 400 нм плотностью мощности  $0,1 \text{ Вт/см}^2$ , суммарная плотность энергии при этом составляет  $15 \text{ Дж/см}^2$ .

3. Методика применения фотодинамической терапии при ведении обширных открытых раневых поверхностей слизистой оболочки полости рта заключается в следующем: в первые сутки послеоперационного периода на раневую поверхность наносят фотосенсибилизатор на 30 минут, после чего его смывают физиологическим раствором (0,9% NaCl) с последующим воздействием светом сверхъярких полупроводниковых светодиодов,

испускаемым излучателями аппарата фототерапевтического светодиодного «Гармония» и доставляемого с помощью специальной насадки. Для излучения с длиной волны 660 нм устанавливают уровень выходной мощности (интенсивность) 0,2 Вт/см<sup>2</sup>, с длиной волны 400 нм – 0,1 Вт/см<sup>2</sup>. Световое воздействие производят на протяжении 37-38 с на длине волны 660 нм и 75 с – на длине волны 400 нм. Курс состоит из одной процедуры.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изучение влияния низкодозной фотодинамической терапии на течение раневого процесса в полости рта в эксперименте (пилотное исследование) / Е. А. Дурново, М. А. Шахова, К. Н. Конторщикова, А. Г. Соловьева, **В. А. Тараканова**, Д. А. Куракина, А. В. Хилов, М. Ю. Кириллин // *Biomedical photonics*. – 2019. - № S4 – с. 39-40;

2. Возможности оптимизации течения раневого процесса на слизистой оболочке в полости рта с использованием фотодинамической терапии / Е. А. Дурново, **В. А. Тараканова** // *Dental forum*. - 2019. - №4. - С. 35;

3. Возможности клинического использования метода инфракрасной термометрии в оценке течения раневого процесса после операции вестибулопластика с использованием свободных десневых трансплантатов / Н. А. Беспалова, Е. А. Дурново, Е. С. Галкина, **В. А. Тараканова**, Н. Б. Рунова // *Пародонтология*. – 2020. – Т. 25. - № 2. – с. 127-133;

4. Изучение состояния оксидативного стресса тканей раневой поверхности в полости рта при воздействии фотодинамической терапии (пилотное исследование) / **В. А. Тараканова**, Е. В. Лебедева, С. А. Дурново // Сборник тезисов VI Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием. - 2020. - С. 530-533;

5. Изучение морфофункциональных реакций раневой поверхности в полости рта в ответ на воздействие низкодозной фотодинамической терапии в эксперименте / Е. А. Дурново, Н. Ю. Орлинская, М. А. Шахова, **В. А. Тараканова**, С. А. Дурново // *Biomedical photonics*. – 2020. - № S4 – с. 20;

6. Проблемы реабилитации пациентов после реконструктивных операций на мягких тканях полости рта / Е. С. Галкина, **В. А. Тараканова**, А. В. Грехов, Е. А. Дурново, А. О. Федоричев // *Наука молодых*. – 2020. - Т. 8. - №4. – с. 609-616;

7. Про-антиоксидантный баланс слизистой оболочки полости рта при воздействии низкодозной ФДТ в эксперименте / Е. А. Дурново, М. А. Шахова, К. Н. Конторщикова, Н. Б. Рунова, **В. А. Тараканова**, И. И. Чекарева // *Лазеры в медицине и биологии: материалы международной научно-практической конференции*. – 2021. – с. 21-22;

8. Окислительно-восстановительный потенциал тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта при фотодинамическом воздействии / Е. А. Дурново, К. Н. Конторщикова, М. А. Шахова, А.Г. Соловьева, **В. А. Тараканова**, Е. С. Галкина // *Стоматология*. – 2021. – Т. 100. - №4. – с. 7-15.

## ПАТЕНТ

Патент 2775939 РФ, МПК А61В 18/20, А61N 5/067, А61К 6/00, А61Р 1/02  
Способ активации регенерации тканей раневой поверхности слизистой оболочки полости рта: № 2021130132: заявл. 15.10.2021: опубл. 12.07.2022/ Дурново Е. А., Шахова М. А., Орлинская Н. Ю., Кириллин М. Ю., Тараканова В. А., Дурново С. А.; патентообладатель ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОСЗ	- антиоксидантная система защиты
ДК	- диеновые конъюгаты
ДхК	- дыхательный компонент
НТ	- нейрогенный тонус
МТ	- миогенный тонус
ОШ	- основания Шиффа
ПМ	- показатель микроциркуляции
ПШ	- показатель шунтирования
ПОЛ	- перекисное окисление липидов
СРО	- свободнорадикальное окисление
СсК	- сердечный компонент
ТК	- триеновые конъюгаты
ЭЗКТ	- эндотелиально-зависимый компонент тонуса