

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ВЕРРУКОЗНОЙ ФОРМЫ ЛЕЙКОПЛАКИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА С ПРИМЕНЕНИЕМ ЛАЗЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

© *Евграфова А.О., Тарасенко И.В., Вавилова Т.П., Тарасенко С.В.*

**Кафедра госпитальной хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии,
кафедра биологической химии
Московского государственного медико-стоматологического университета, Москва
E-mail: evgrafova_ao@mail.ru**

При комплексном лечении веррукозной формы лейкоплакии слизистой оболочки полости рта для иссечения поражённой слизистой оболочки было использовано излучение углекислого (CO₂) и эрбиевого (Er:YAG) лазеров. Показано многофакторное действие хирургического лазера: обеспечение гемостаза, обезболивание и формирование коагуляционного слоя на раневой поверхности так называемой «лазерной повязки», что позволяет иссекать обширные участки поражённой слизистой оболочки без последующего наложения йодоформного тампона. После лазерного лечения в участке иссечения ускоряются процессы регенерации и предотвращаются рецидивы заболевания. Каспаза 9 в смешанной слюне у пациентов не определялась, а количество аннексина V в смешанной слюне пациентов отражает возможные проявления апоптоза клеток в области лейкоплакии слизистой оболочки.

Ключевые слова: веррукозная форма лейкоплакии, хирургическое лечение, углекислый лазер, эрбиевый лазер, смешанная слюна, каспаза-9, аннексин V.

CLINICAL AND BIOCHEMICAL EVALUATION OF SURGICAL TREATMENT OF VERRUCOUS LEUKOPLAKIA BY LASER TECHNOLOGY

Evgrafova A.O., Tarasenko I.V., Vavilova T.P., Tarasenko S.V.

**Department of Hospital Surgical Stomatology & Maxillofacial Surgery,
Biochemistry Department of the Moscow State Medical-Stomatology University, Moscow**

In complex treatment of verrucous leukoplakia of the oral mucosa for excision of mucosa CO₂ and Er: YAG lasers has been used. Multifactorial activity of the surgical laser, such as providing of haemostasis, anesthesia, formation of "laser bandage" was demonstrated. It gives an opportunity of good visualization of the surgical area, and possibility of removing extensive leukoplakia sites without using iodoform tampon. Laser treatment accelerates tissue regeneration and prevent the recurrence of the disease. Caspase 9 in saliva of patients is not determined, and the number of annexin V in saliva of patients reflects the possible manifestations of apoptosis in leukoplakia of the mucous membrane.

Keywords: verrucous leukoplakia, surgical treatment, CO₂ laser, Er: YAG laser, saliva, caspase-9, annexin V.

Лейкоплакия – довольно распространенное заболевание слизистой оболочки полости рта, протекающие с нарушением процессов ороговения и встречающиеся у 7-10% больных на специализированном приеме. Этот вид патологии более характерен для лиц старшего возраста, и относится к предраковым заболеваниям с различной степенью потенциальной злокачественности, варьирующей в зависимости от формы заболевания и локализации процесса от 6-7% до 15-20% [1, 3, 5, 7, 8, 13, 18]. По классификации А.Л. Машкиллейсона (1984) существует несколько форм лейкоплакии: простая или плоская, веррукозная (которая, в свою очередь, подразделяется на бляшечную и бородавчатую), эрозивно-язвенная, лейкоплакия Таппейнейра (никотиновый стоматит), мягкая лейкоплакия. Наиболее выраженную склонность к злокачественной трансформации имеет пролиферативная веррукозная форма лейкоплакии с бородавчатыми разрастаниями на поверхности, которая трансформируется в рак в 70% случаев. Переход в злокаче-

ственную форму связан с апоптотическими изменениями в области поражения. Под апоптозом понимают запрограммированную асинхронную гибель клеток, которая обеспечивает их физиологическое равновесие и стабильность тканей за счет самоуничтожения генетически чужеродных и/или дефектных клеток. Ранее проведенные гистохимические и электромикроскопические исследования клеток при лейкоплакии слизистой оболочки полости рта позволили констатировать в участках поражения нарушение регуляции процессов апоптоза. В развитии и регуляции апоптоза участвует множество белков, в частности протеолитический фермент – каспаза-9 и кальций-связывающий белок аннексин V, который, прикрепляясь к поверхности клеточной мембраны, может задерживать их апоптоз. Поэтому закономерно исследование белков, характеризующих апоптоз, для прогнозирования озлокачествления данного патологического процесса [2, 11, 14, 15, 17].

Эффективность оказания помощи больным с данной формой патологии определяется не только своевременной диагностикой заболевания, но и выбором оптимального метода лечения. При традиционном хирургическом лечении веррукозной формы лейкоплакии возможны рецидивы и нарушение процессов регенерации в послеоперационном периоде. В последнее время для хирургического лечения веррукозной формы лейкоплакии используются различные лазерные технологии [5, 6, 8]. Вместе с тем при лечении с помощью излучения только углекислотного лазера [5] возможен рецидив данного заболевания. Это обусловлено тем, что при использовании углекислотного лазера в абляционном режиме невозможно четко определить границы области оперативного вмешательства (могут остаться участки, пораженные лейкоплакией) и нет возможности осуществить проведение гистологического исследования. Поэтому необходимо искать пути, позволяющие более щадяще иссекать пораженные участки слизистой полости рта. Ранее проведенные исследования показали, что для операций на мягких тканях можно использовать и другие виды лазеров, в частности эрбиевый [12, 16].

Цель исследования. Повысить эффективность оказания помощи больным с веррукозной формой лейкоплакии слизистой оболочки полости рта путём применения различных видов лазерного излучения с биохимическим мониторингом количества каспазы-9 и аннексина V.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В Центре стоматологии и челюстно-лицевой хирургии МГМСУ нами проведено обследование и лечение 50 пациентов с веррукозной формой лейкоплакии. У 30 пациентов иссечение участков патологически изменённой слизистой оболочки полости рта проводилось стандартным хирургическим методом, а 20 пациентам (12 женщин и 8 мужчин), средний возраст которых составил $58,1 \pm 5,68$ года, проводилось хирургическое иссечение пораженных участков слизистой оболочки с помощью лазерного излучения. Использованы эрбиевый и углекислый лазеры фирмы ДЕКА (Италия). Клиническое стоматологическое обследование больных выполняли по общепринятой методике до лечения, а также на третьи и десятые сутки после лечения. На доклиническом этапе оно включало сбор анамнеза, осмотр полости рта, участка поражения. Перед проведением хирургического лечения все пациенты подписывали информированное согласие.

Обследование пациентов с веррукозной формой лейкоплакии слизистой оболочки полости

рта показало, что площадь поражения варьировала от 0,25 до 6,0 см² и в среднем равнялась $2,28 \pm 0,40$ см². Длительность заболевания у обследованных пациентов в среднем составила 1,5 года. По данным анамнеза 9 пациентов (45%) отрицали наличие вредных привычек, 9 пациентов (45%) курили, а 2 пациента (10%) злоупотребляли алкоголем.

Разделение пациентов на группы по способу хирургического лечения различными видами лазерного излучения проводилось методом случайной выборки. Пациентам первой группы (n=6) участки лейкоплакии на слизистой оболочке рта иссекали излучением эрбиевого лазера с длинной волны 2940 нм., в режиме абляции сфокусированным лучом на расстоянии 0,5 см сапфирового фибера от раневой поверхности: мощность 4 Вт, импульс 700 мс в режиме "long", энергия 300 мДж, частота 20 Гц, время экспозиции 15 с на 1 см² с водно-воздушным спреем.

Пациентам второй группы (n=5) для удаления поражённого участка слизистой оболочки полости рта применяли излучение углекислотного лазера с длиной волны 10,6 мкм, мощностью 3 Вт, частотой 15 Гц. Методика операции сводилась к выпариванию участка поражённой слизистой оболочки. Операция проходила бескровно, в результате операции образовывался слой коагулированных тканей с участками карбонизации, под которым происходило заживление раны около двух недель.

Пациентам третьей группы (n=9) проводили комбинированное хирургическое лечение двумя видами лазерного излучения. Вначале излучением эрбиевого лазера иссекали участки лейкоплакии слизистой оболочки ротовой полости, а затем рану коагулировали излучением углекислотного лазера (рис. 1, 2, 3, 4).

Забор образцов смешанной слюны проводился до оперативного вмешательства, а также через 3 и 10 дней после операции без стимуляции в течение 5 минут путём сплёвывания в стерильную стеклянную пробирку. Затем полученную смешанную слюну центрифугировали и отделяли надосадочную жидкость (супернатант). Супернатанты смешанной слюны до начала исследования хранили при температуре -28°C. После однократного размораживания в образцах смешанной слюны методом иммуноферментного анализа определяли количество аннексина V и каспазы-9 в нг/мл. Для сравнительного анализа был осуществлён забор образцов смешанной слюны у 5 здоровых пациентов, не имеющих в анамнезе соматических патологий и воспалительных изменений в полости рта.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Microsoft Ex-

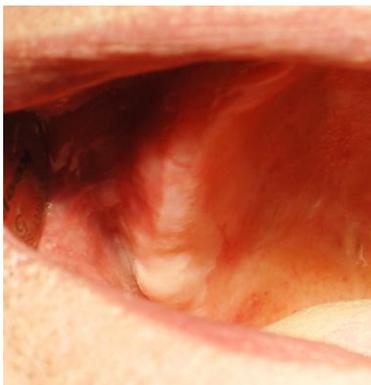


Рис. 1. Участок лейкоплакии на слизистой оболочке альвеолярного отростка верхней челюсти.



Рис. 2. Операция иссечения участка лейкоплакии излучением эрбиевого лазера.



Рис. 3. Сформированная излучением эрбиевого лазера «лазерная повязка».



Рис. 4. Состояние слизистой оболочки через 1 месяц после операции.

cel и пакета прикладных программ Statistica 6.0. Данные представлены как среднее и стандартное отклонение для нормального распределения. Значимость различий для количественных переменных между несвязанными группами оценивалась по критерию Манна-Уитни, значимость различий в связанных группах оценивалась по критерию Вилкоксона. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе оперативного вмешательства при использовании излучения эрбиевого лазера у пациентов I группы было небольшое кровотечение, которое незначительно ухудшало обзор операционного поля. Однако этого не наблюдалось у пациентов III группы при сочетанном использовании излучения эрбиевого и углекислотного лазеров. По данным клинических исследований в раннем послеоперационном периоде у пациентов I и III групп не отмечалось выраженного коллатерального отёка и болевого синдрома, поэтому отпадала необходимость в назначении нестероидных противовоспалительных обезболивающих средств. При использовании только излучения углекислотного лазера у пациентов II группы отмечался слабо выраженный коллатеральный отёк и болевой синдром в первые сутки после операции (табл. 1).

Обследование раны в раннем послеоперационном периоде показало, что после операции с применением излучения эрбиевого лазера у пациентов I группы и комбинированного излучения эрбиевого и углекислотного лазеров у пациентов III группы полная эпителизация наступала на 7-е сутки, а при использовании углекислотного лазера у пациентов II группы рана эпителизовалась лишь на 14-е сутки. Ткани послеоперационной

области на 30-е сутки, после применения излучения хирургических лазеров у пациентов I, II и III групп были мягкие, эластичные, не отмечалось грубых рубцов. Обследование в отдалённые сроки в течение 1-3 лет показало, что рецидивов заболевания не наблюдалось. Следует отметить, что при традиционном методе лечения веррукозной формы лейкоплакии на фоне приёма обезболивающих средств пациенты отмечали боль и отёк в течение первых 3 суток после оперативного вмешательства. Эпителизация послеоперационной области у пациентов при стандартном методе хирургического лечения веррукозной формы лейкоплакии происходила на 14-е сутки, а на 30-е сутки наблюдалось образование грубой рубцовой ткани. У пациентов всех групп гнойно-воспалительные осложнения в послеоперационном периоде отсутствовали.

Исследование образцов смешанной слюны показало, что у пациентов с веррукозной формой лейкоплакии до оперативного вмешательства содержание аннексина V составляло $2,60 \pm 0,19$ нг/мл, что в 3 раза выше, относительно его количества у лиц контрольной группы, которое равнялось $0,81 \pm 0,26$ нг/мл.

В слюне лиц контрольной группы и 19 пациентов с лейкоплакией не определялось содержание каспазы-9 и только у одной пациентки выявлялось его наличие, которое равнялось $0,55$ нг/мл.

После проведённого хирургического лечения веррукозной формы лейкоплакии излучением эрбиевого лазера у пациентов I группы, а также после сочетанного действия излучений различных лазеров, количество аннексина V в смешанной слюне на 3-и сутки увеличивалось, но это увеличение было недостоверным ($p < 0,05$) как по отношению к значениям, полученным у пациентов до оперативного вмешательства, так и к показателям этого белка у лиц контрольной группы (табл.2).

Таблица 1

Характеристика течения послеоперационного периода

Группы	Сроки эпителизации	Болевой синдром			Коллатеральный отёк		
		1-е сутки после операции	3-и сутки после операции	10-е сутки после операции	1-е сутки после операции	3-и сутки после операции	10-е сутки после операции
I группа Er:YAG лазер (n=6)	7-е сутки	0	0	0	0	0	0
II группа CO ₂ лазер (n=5)	14-е сутки	+	0	0	+	0	0
III группа Er:YAG+CO ₂ лазер (n=9)	7-е сутки	0	0	0	0	0	0

Примечание: шкала: +++ - очень сильно выражено; ++ - выражено в средней степени; + - слабо выражено; 0 – отсутствует.

Исследование количества каспазы-9 в смешанной слюне у пациентов с веррукозной формой лейкоплакии после проведенных операций показало, что в общей массе пациентов всех трёх групп после операции его содержание не выявлялось.

Таким образом, биохимические исследования показали, что имеются изменения в количестве аннексина V в смешанной слюне у пациентов с веррукозной формой лейкоплакии, что свидетельствует о возможности проявления апоптоза клеток в участке поражения. Применение лазерных технологий в хирургическом лечении веррукозной формы лейкоплакии не приводило к развитию послеоперационной болевой реакции, гнойно-воспалительных осложнений, образованию коллатерального отека, сокращает сроки заживления, способствовало формированию мягкой эластичной рубцовой ткани.

Более благоприятная картина наблюдается у пациентов после использования хирургических лазерных технологий, причем наиболее эффективным является сочетанное применение излучения эрбиевого и углекислого лазера, о чём свидетельствуют помимо клинических данных и биохимические показатели исследования смешанной слюны.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Анисимова И.В.* Онкологическая настороженность в практике врача-стоматолога // Институт стоматологии. – 2009. – № 45. – С. 52–53
2. *Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В.* Иммунологические проблемы апоптоза. – М.: Эдиториал УРСС. – 2002. – С. 230.
3. *Бочарова О.А., Пожарицкая М.Н., Чекалина Т.Л. и др.* Лейкоплакия слизистой оболочки полости рта: патогенез и возможности коррекции фитоадаптогеном // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 138, № 12. – С. 652–657.
4. *Брусенина Н.Д., Тарасенко С.В., Рыбалкина Е.А. и др.* Опыт комплексного лечения хронических заболеваний слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ // Стоматология для всех. – 2007. – № 3. – С. 14–17.
5. *Джанаева У.Р., Лаптев П.И.* Клинико-морфологическое обоснование выбора режимов CO₂ лазерного воздействия при лечении предраковых заболеваний слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ // Проблемы стоматологии и нейростоматологии. – 1999. – № 4. – С. 18–20.
6. *Лангле Р.П., Миллер К.С.* Атлас заболеваний полости рта. – ГЭОТАР-Медиа. – 2008. – 224 с.
7. *Машикеллейсон А.Л.* Предрак красной каймы губ и слизистой оболочки рта. – М.: Медицина, 1970. – 280 с.
8. *Позднякова Т.И., Зуйков Ю.А.* Альтернативные методы лечения веррукозной лейкоплакии слизистой оболочки полости рта. // Кафедра. – 2007. – № 1. – С. 24–26.
9. *Рисованный С.И.* Применение углекислотных лазеров для работы на мягких тканях // Dental Market. – 2005. – № 2. – С. 22–24.
10. *Самородов В.Г., Нистратов В.И., Прохончуков А.А.* Лазерный хирургический стоматологический аппарат для лечения стоматологических заболеваний. // Труды VI съезда Стоматологической ассоциации России. – Москва, 2000. – С. 427–428.
11. *Солнышкина А.Ф.* Морфология предраковых поражений слизистой оболочки полости рта // Верхневолжский медицинский журнал. – 2006. – Спецвыпуск. – С. 64–65.
12. *Тарасенко С.В.* Применение Er:YAG лазера в стоматологии. // Материалы IV Российского научного форума «Стоматология-2004». – М., 2004. – С. 146–147
13. *Bouquot J.E., Gnepp D.R.* Laryngeal precancer - a review of the literature, commentary and comparison with oral leukoplakia // Head Neck. – 1991. – N 13. – P. 488–497.
14. *Cederholm A., Frostegård J.* Annexin A5 as a novel player in prevention of atherothrombosis in SLE and in the general population // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 1108. – P. 96–103.
15. *Huber R., Berendes R., Burger A. et al.* Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins // J. Mol. Biol. – 1992. – Vol. 223, N 3. – P. 683–704.
16. *Tarassenko I.V., Lazarihina N.M., Sturova T.M.* The using of surgical lasers in the preprosthetic surgery // J. of Cranio-Maxillofacial Surgery, Abstracts from the XVIII Congress of the European for of Cranio-Maxillofacial Surgery, 12th-15th September 2006. – Barcelona – P. 147–148.
17. *Tortorici S., Mauro A., Burrano F. et al.* Matrix metalloproteinase-2 matrix metalloproteinase-9 and inducible nitric oxide synthase in oral leukoplakia: immunohistochemistry and RT-PCR analysis // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. – 2008. – Vol. 22, N 125. – P. 30.
18. *Silverman S., Gorsky M., Lozada F.* Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients // Cancer. – 1984. – Vol. 53. – P. 563–568.