



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.7.1.002>
УДК 616.311-002-085:612.08:[615.35:615.831]



Карпук Н.А.¹ ✉, Рубникович С.П.², Медведев М.Н.¹

¹ Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Регенерация слизистой оболочки ротовой полости под влиянием рибофлавина и диодного лазера на экспериментальной модели предопухолевого заболевания

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: дизайн исследования, цель, формулирование задач – Рубникович С.П., Карпук Н.А.; участие во всех этапах экспериментального исследования, анализ научной литературы, интерпретация полученных данных и их систематизация, статистическая обработка с описанием полученных результатов, написание и оформление публикации – Карпук Н.А.; изучение морфофункциональных изменений слизистой оболочки ротовой полости крыс на базе кафедры патологической анатомии ВГМУ – Медведев М.Н.

Исследование выполнено в рамках:

- гранта Президента Республики Беларусь в сфере здравоохранения на 2022 год (распоряжение Президента Республики Беларусь № 45рп от 01 марта 2022 г.);
- финансирования БРФФИ: «Клиническое значение защитных белков ротовой жидкости у пациентов с заболеваниями периодонта и слизистой оболочки рта после перенесенной коронавирусной инфекции», номер госрегистрации: 20221321 от 01.08.2022.

Подана: 18.01.2023

Принята: 20.03.2023

Контакты: ikarpuk@mail.ru

Резюме

Предопухолевые заболевания слизистой оболочки ротовой полости (ПЗСОРП) являются актуальной медицинской проблемой общественного здравоохранения.

Цель исследования. Изучение влияния рибофлавина и диодного лазера на регенерацию слизистой оболочки ротовой полости на экспериментальной модели предопухолевого заболевания.

Материалы и методы. Исследования проводились на 480 самцах белых беспородных крыс массой 180–200 г (в возрасте 6–7 месяцев), которые в течение двух недель до начала эксперимента проходили карантин. Животные были случайным образом разделены на 4 группы по 3 подгруппы, в каждой из которых по 30 крыс. Лечение проводили ежедневно в 9.00 один раз в день.

ПЗСОРП моделировали путем аппликации животным раствора 4-НХО (канцероген) в концентрации 50 мг/мл на слизистую оболочку ротовой полости (СОРП) нижней губы три раза в день: в 9.00, 14.00 и 19.00 в сочетании с воздействием 3D-устройства с травмирующим элементом.

Крысам 1-й группы проводили манипуляции, сопоставимые с проводимыми при лечении лазером, но без засвечивания. Крысам 2-й группы проводили манипуляции, сопоставимые с лечением лазером, но без засвечивания, и аппликацию чистого водного раствора на пораженный участок СОРП (вместо рибофлавина). Крысам 3-й группы проводили местно аппликации масляных растворов витаминов А, Е – 5%, метилурацила 5–10% мази; 0,05% раствора хлоргексидина на протяжении 10 дней.

Крысам 4-й группы проводили лечение предлагаемым нами методом путем внутрижелудочного введения витамина В₂ (рибофлавина) в дозировке 1,8 мг на протяжении 24 дней. На 15-й день после начала внутрижелудочного введения витамина В₂ проводили лазеротерапию на протяжении 10 дней местно один раз в день, последовательно воздействуя на очаг поражения СОРП лазерным излучением фиолетового спектра с длиной волны 405±5 нм и красного спектра света с длиной волны 650±5 нм по 3 минуты облучения каждого.

Результаты. Отмечена нормализация морфологических изменений (дистрофических, воспалительных, диспластических и пролиферативных) под влиянием местного и системного применения рибофлавина и последовательного воздействия лазерами фиолетового и красного спектра света с рабочими длинами волн 405±5 и 650±5 нм соответственно.

Выводы. Предлагаемый метод лечения можно рекомендовать пациентам с ПЗСОРП как простой, хорошо переносимый (минимальный риск развития осложнений и побочных реакций), недорогой, эффективный, реализуемый в условиях стоматологической поликлиники.

Ключевые слова: предопухоловые заболевания, канцероген, рибофлавин, диодный лазер

Karpuk N.¹ ✉, Rubnikovich S.², Medvedev M.¹

¹ Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Regeneration of the Oral Mucosa under the Influence of Riboflavin and a Diode Laser on an Experimental Model of Precancerous Disease

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research design, goal, formulation of tasks – Rubnikovich S., Karpuk N.; participation in all stages of the experimental study, analysis of scientific literature, interpretation of the data obtained and their systematization, statistical processing with a description of the results obtained, writing and design of the publication – Karpuk N.; study of morphofunctional changes in the oral mucosa of rats on the basis of the Department of Pathological Anatomy of the VSMU – Medvedev M.

The study was carried out within the framework of:

- Grant of the President of the Republic of Belarus in the field of healthcare for 2022 (Decree of the President of the Republic of Belarus No. 45rp dated March 01, 2022);
- BRFFR funding: "Clinical significance of oral fluid protective proteins in patients with periodontal and oral mucosal diseases after coronavirus infection", state registration number: 20221321 dated 08/01/2022.

Submitted: 18.01.2023

Accepted: 20.03.2023

Contacts: ikarpuk@mail.ru

Abstract

Precancerous diseases of the oral mucosa (PDOM) are an urgent medical problem of public health.

The aim of the study. To study the effect of riboflavin and a diode laser on the regeneration of the oral mucosa on an experimental model of precancerous disease.



Materials and methods. The studies were conducted on 480 male white mongrel rats weighing 180–200 g (aged 6–7 months), which were quarantined for two weeks before the start of the experiment. The animals were randomly divided into 4 groups of 3 subgroups, each with 30 rats. Treatment was carried out daily at 9.00 once a day.

PDOM was modeled by applying to animals a solution of 4-NQO (carcinogen) at a concentration of 50 mg/ml on the oral mucosa (OM) of the lower lip three times a day: at 9.00, 14.00 and 19.00 in combination with exposure to a 3D-device with a traumatic element.

The rats of group 1 underwent manipulations comparable to those carried out during laser treatment, but without illumination. Group 2 rats underwent manipulations comparable to laser treatment, but without illumination and application of a pure aqueous solution to the affected area of OM (instead of riboflavin). The rats of group 3 were topically applied with oil solutions of vitamins A, E – 5%, methyluracil 5–10% ointment; 0.05% chlorhexidine solution for 10 days. Group 4 rats were treated with our proposed method by intragastric administration of vitamin B₂ (riboflavin) at a dosage of 1.8 mg for 24 days. On the 15-th day after the start of intragastric administration of vitamin B₂, laser therapy was performed for 10 days, locally once a day, successively affecting the lesion of OM with laser radiation of the violet spectrum with a wavelength of 405±5 nm and red light spectrum with a wavelength of 650±5 nm for 3 minutes of irradiation each.

Results. The normalization of morphological changes (dystrophic, inflammatory, dysplastic and proliferative) was noted under the influence of local and systemic use of riboflavin and consistent exposure to violet and red light spectrum lasers with operating wavelengths of 650±5 and 405±5 nm.

Conclusion. The proposed method of treatment can be recommended to patients with PDOM as simple, well-tolerated (minimal risk of complications and adverse reactions) inexpensive, effective, implemented in a dental clinic.

Keywords: precancerous diseases, carcinogen, riboflavin, diode laser

■ ВВЕДЕНИЕ

Рак слизистой оболочки ротовой полости (СОРП) является значимой медицинской проблемой с выраженной тенденцией к росту заболеваемости. Большинству случаев рака полости рта предшествуют некоторые видимые клинические изменения на СОРП или предопухолевые заболевания [1].

Предопухолевые заболевания слизистой оболочки ротовой полости (ПЗСОРП) включают лейкоплакию, эритроплакию, красный плоский лишай полости рта, подслизистый фиброз полости рта и характеризуются повышенным риском злокачественной трансформации [2].

Средний уровень злокачественной трансформации при ПЗСОРП для всей популяции, описанный в 24 исследованиях, составляет 3,5% с широким диапазоном от 0,13% до 34% [2–4].

При злокачественной трансформации происходит накопление генетических и эпигенетических изменений эпителия СОРП, что характеризуется рядом четко определенных клинических и гистологических изменений, отражающих дисплазию, являющуюся показателем злокачественного потенциала [5, 6].

Поскольку дисплазия эпителия СОРП представляет собой нестабильную патологическую форму и не имеет присущей только ей клинической симптоматики и отражает результат предшествующего патологического воздействия компонентами зубопротезных материалов, пищевых и лекарственных аллергенов [7–9]. На определенных этапах своего развития процесс обратим, а своевременное и рациональное лечение заболеваний СОРП при дисплазии эпителия предупреждает развитие злокачественной опухоли [10].

Следовательно, СОРП является шоковой тканью для развития различных иммунопатологических реакций. Однако, с другой стороны, СОРП удобная структура для консервативной терапии, так как доступна для воздействий, которые на ней достаточно безопасны, а она активно реагирует на них за счет тесной связи с миндалинами [11, 12].

Хирургическое лечение ПЗСОРП может проводиться с использованием традиционного метода иссечения скальпелем, электро- и криохирургии, а также иссечения лазерами с высокоинтенсивными излучателями, действие которых основано на способности лазерного света рассекать, коагулировать и аблировать (выпаривать) биологическую ткань (аргоновый лазер; Er-Cr: YSGG-лазер; Nd: YAG, CO₂; диодные лазеры). Недостатками хирургического лечения являются частые рецидивы ЛСОРП, которые регистрируются в 10–35% случаев, а также образование грубых рубцовых изменений, требующих последующей коррекции [13, 14].

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является еще одним эффективным методом лечения ПЗСОРП, поскольку ее можно использовать повторно без кумулятивных побочных эффектов и она приводит к незначительному образованию рубцов (или вообще без них). Во время ФДТ генерируемые активные формы кислорода (АФК) могут разрушать пораженные клетки или повреждать связанную с ними сосудистую сеть, а также активировать иммунный ответ [15, 16].

Разработанный в Республике Беларусь метод лечения ПЗСОРП, включающий ФДТ с фотосенсибилизатором Фотолон [17], является весьма эффективным. Недостатком данного метода является необходимость внутривенного введения фотосенсибилизатора, что ограничивает широкое применение способа на амбулаторном приеме врачами-стоматологами, а также его высокая стоимость.

Рибофлавин (витамин В₂) считается одним из наиболее перспективных агентов для ФДТ. Продемонстрирована возможность местного и системного применения рибофлавина в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ [18, 19]. Поэтому применение диодного лазера с облучением, соответствующим спектру поглощения рибофлавина, является весьма перспективным научным направлением.

Таким образом, использование лазера для решения различных клинических ситуаций является весьма актуальным направлением в стоматологии [20–23]. Поэтому разработка простого недорогого и доступного метода лечения ПЗСОРП с использованием лазерного излучения в сочетании с рибофлавином является актуальным направлением современной медицины, позволяющим реализовать его в условиях стоматологической поликлиники.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния рибофлавина и диодного лазера на регенерацию СОРП на экспериментальной модели предопухолевого заболевания.



■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на 480 самцах белых беспородных крыс массой 180–200 г (в возрасте 6–7 месяцев), которые в течение двух недель до начала эксперимента проходили карантин. Животные содержались в виварии НИЛ ВГМУ в поликарбонатных клетках, покрытых стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, размером 20×30×40, по четыре крысы в клетке. Манипуляции с животными проводились в соответствии с рекомендациями по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Для включения в исследование отбирали подвижных с чистым гладким шерстяным покровом здоровых крыс.

Этапы экспериментального моделирования ПЗСОРП с дисплазией:

1. Приготовление канцерогена. Канцероген 4-НХО (каталожный номер Sigma-Aldrich – N8141) растворяли в 100% диметилсульфоксиде и хранили при –20 °С без доступа света. Каждую неделю, перед началом выпаивания животных, готовили свежий раствор 4-НХО в питьевой воде в концентрации 50 мг/мл.
 2. Этапы создания травмирующего 3D-устройства.
 - 2.1. Изготовление 3D-устройства.
 - 2.2. Сканирование нижних резцов животного (крысы). Под внутривенным тиопенталовым наркозом получали 3D-изображение нижних центральных резцов крысы с использованием интраорального сканера.
 - 2.3. Моделирование фиксирующей части 3D-устройства. Для этого с использованием специальной компьютерной программы моделировали конструкцию в виде центрального нижнего резца человека (программа не рассчитана на животных) с толщиной коронки 0,5 мм и сохраняли в виде stl-файла для последующего изготовления.
 - 2.4. Изготовление травмирующего элемента аддитивным методом. В нижней трети с вестибулярной стороны фиксирующей части 3D-устройства моделировали травмирующий элемент в виде 5 шипов с острыми краями длиной 1,5–2,5 мм и печатали на 3D-принтере из стоматологического полимера.
 3. Этапы экспериментального моделирования предопухолевых поражений слизистой оболочки рта с применением травмирующего 3D-устройства.
 - 3.1. Для обездвиживания грызунов с целью создания оптимальных условий для фиксации 3D-устройства крысам вводили внутривенно тиопенталовый наркоз.
 - 3.2. Стерильной марлевой салфеткой высушивали нижние резцы крысы.
 - 3.3. 3D-устройство фиксировали на композиционный цемент двойного отверждения, излишки композита удаляли гладилкой, после чего фотополимеризовали согласно инструкции производителя.
 - 3.4. 3D-устройство удаляли путем распиливания и заменяли на новое каждые 5 дней.
 - 3.5. В течение 28 недель пораженный участок СОРП крысы обрабатывали ватным тампоном, смоченным в водном растворе 4-НХО, по 3 раза в день.
- Развитие кератоза, гиперплазии и дисплазии эпителия СОРП нижней губы достигалось через 12 недель у 100% животных ($p < 0,05$).

Лечение ЛСОРП

Изготовление раствора рибофлавина. Для получения 100 мл 0,0018% раствора брали 0,0018 г (1,8 мг) рибофлавина (использовали фармацевтическую субстанцию) и 100 мл воды очищенной. Так как масса фармацевтической субстанции, необходимой для изготовления раствора, менее 0,05 г, сначала готовили 250 мл 0,02% раствора рибофлавина, затем получали 0,0018% раствор. Растворы не устойчивы при хранении на свету, особенно в присутствии щелочи [24]. Для расчета необходимого объема 0,02% раствора рибофлавина и воды очищенной использовали формулу разведения:

$$V = \frac{V_1 \times C_1}{C}$$

где V – объем раствора с большей концентрацией, необходимый для изготовления раствора требуемой концентрации, мл;

V_1 – требуемый объем изготавливаемого раствора, мл;

C_1 – требуемая концентрация раствора, %;

C – концентрация исходного раствора.

$$\frac{0,0018 \times 100}{0,02} = 9 \text{ мл (раствора рибофлавина 0,02\%)}$$

$$V \text{ (воды очищенной)} = 100 \text{ мл} - 9 \text{ мл} = 91 \text{ мл}$$

С 13-й недели начинали экспериментальное исследование предлагаемого метода лечения ПЗСОРП (табл. 1). Лечение проводили ежедневно в 9.00 один раз в день.

Индивидуальная идентификация животных проводилась путем окраски различных участков шерстяного покрова спиртовым раствором пикриновой кислоты.

Таблица 1

Характеристика групп экспериментального исследования (n=480)

Table 1

Characteristics of the experimental research model (n=480)

№ группы	Группы животных	Способ воздействия
1	1-я контрольная (плацебо) (n=120)	Манипуляции, сопоставимые с проводимыми при лечении лазером, но без засвечивания
2	2-я контрольная (плацебо) (n=120)	Манипуляции, сопоставимые с проводимыми при лечении лазером, но без засвечивания, и аппликация чистого водного раствора на пораженный участок СОРП (вместо рибофлавина)
3	Традиционная терапия (n=120)	Местно аппликации масляных растворов витаминов А, Е – 5%, метилурацила 5–10% мази; 0,05% раствора хлоргексидина на протяжении 10 дней [25]
4	Предлагаемый метод (n=120)	Внутрижелудочное введение витамина В ₂ (рибофлавина) в дозировке 1,8 мг на протяжении 24 дней. На 15-й день после начала внутрижелудочного введения витамина В ₂ проводили лазеротерапию на протяжении 10 дней местно один раз в день, последовательно воздействуя на очаг поражения СОРП излучением фиолетового спектра с длиной волны 405±5 нм и красного спектра света с длиной волны 650±5 нм по 3 минуты облучения каждого (см. рисунок)



A



B

Воздействие на очаг поражения СОРП крысы лазерным излучением: А – излучение фиолетового спектра; В – излучение красного спектра

Каждую крысу классифицировали в соответствии с поражением самого высокого уровня, обнаруженным на слизистой оболочке нижней губы.

В каждой группе насчитывалось по 90 особей, забой проводился по 30 животных в каждой группе через 10, 20 и 30 дней от начала лечения. Оценка эффективности проведенного лечения ПЗСОРП у животных проводилась с использованием морфологических признаков, указанных в табл. 2.

Выведение животных из эксперимента осуществлялось под эфирным наркозом путем декапитации. Сразу после вскрытия проводилось визуальное исследование ротовой полости крыс, измерение очагов патоморфологических изменений слизистой оболочки губ и языка, брались мазки для цитологического исследования. Затем головы грызунов погружали в 10%-й раствор формалина с фосфатным буфером. После фиксации изучаемые участки нижних губ животных были обезвожены в автоматическом процессоре Microm STP-120 и уплотнены путем заливки в парафин при помощи аппарата ЕС-350. После чего срезы образцов ткани (толщиной 4–5 мкм) изготавливались на роторном микротоме Leica RM 2125 и окрашивались в аппарате Microm HMS-170 гематоксилин-эозином для микроскопического изучения по общепринятым методикам. Исследовались гистологические препараты органов и цитомазки на микроскопе Leica DM 2500 (окуляр $\times 10$, объективы $\times 10, 20, 40, 100$), оснащенном цифровой камерой Leica DFC 320.

Статистическая обработка полученных данных. Полученные данные проверяли на соответствие распределению Гаусса. Для этого применяли количественный тест Shapiro – Wilk, строили квартильные графики, изучали гистограмму распределения изучаемого показателя. Данные обрабатывались с помощью критерия T-test и парного теста Wilcoxon Matched Pairs Test с указанием уровня достоверности расчета (p). Для сравнения качественных данных, которые можно представить в виде таблиц сопряженности 2 \times 2, применяли тест Fisher.

Таблица 2
Морфологические признаки для оценки эффективности проведенного лечения
Table 2
Morphological features for evaluating the effectiveness of the treatment

Морфологический признак	Баллы	Критерии оценки
Расширение базального слоя МПЭ (базально-клеточная гиперплазия) Беспорядочность расположения клеток с явлениями атипии Потеря полярности эпителиальных клеток Акантоз	0	нет
	1	1/3 толщи эпителиального пласта
	2	2/3 толщи эпителиального пласта
	3	более 2/3 эпителиального пласта
Увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения Наличие клеток с ядерной гиперхромазией	0	нет
	1	0–30% от общего числа клеток
	2	31–70% от общего числа клеток
	3	71–100% от общего числа клеток
Увеличение числа клеток с нормальными и аномальными фигурами митоза	0	
	1	в пределах 1/3 толщи эпителиального пласта 1–5 клеток
	2	в пределах от 1/3 до 2/3 толщи эпителиального пласта до 10 клеток
	3	более 2/3 эпителиального пласта более 10 клеток
Дискератоз (клетки с признаками ороговения от общего числа в поверхностном слое МПЭ) Акантолиз (клеток от общего числа в шиповатом слое)	0	нет
	1	0–30%
	2	31–70%
	3	71–100%
Наличие воспалительной реакции в подслизистой основе	0	нет
	1	до 10 воспалительных клеток
	2	10–20 воспалительных клеток
	3	более 20 воспалительных клеток

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На 12-й неделе экспериментального моделирования ЛСОРП до начала лечения при гистологическом исследовании слизистой нижней губы крыс отмечались выраженный гиперкератоз и гиперплазия, а также диспластические изменения легкой и средней степени (табл. 3).

Через 10 дней от начала лечения в группах 1 и 2 как клиническая, так и морфологическая динамика отсутствовала. В группе 3 полное излечение по гистологическим данным наблюдалось у 2 животных. При этом отмечалась регрессия всех оцениваемых морфологических признаков. Визуально (клинически) излечение отмечалось у 3 животных. Эффект был достигнут за счет исчезновения таких морфологических признаков, как акантоз, дискератоз и акантолиз. В группе 4 в 8 наблюдениях отмечалось визуальное (клиническое) выздоровление в основном за счет уменьшения дискератоза, акантолиза и акантоза (табл. 4). Статистически значимое снижение баллов в группах 3 и 4 касалось таких признаков, как дискератоз и акантолиз. Однако при сравнении групп 3 и 4 данные критерии значимо между собой не отличались. Резко выраженное снижение воспалительной реакции в группе 3 по сравнению с группой 4 объясняется характером проведенного лечения (преимущественно противовоспалительное) в группе 3.

Таблица 3
Результаты гистологического исследования слизистой оболочки нижней губы через 12 недель после начала экспериментального моделирования ПЗСОРП до начала лечения
Table 3

Results of histological examination of the mucous membrane of the lower lip 12 weeks after the start of experimental modeling of PDOM before the start of treatment

Морфологический признак	Баллы	Степень выраженности морфологических изменений в группах животных			
		1 (n=30)	2 (n=30)	3 (n=30)	4 (n=30)
1. Расширение базального слоя МПЭ (базально-клеточная гиперплазия)	0	0	0	0	0
	1	4	6	4	0
	2	11	11	13	15
	3	15	14	13	15
Сумма баллов		71	70	69	75
2. Беспорядочность расположения клеток с явлениями атипии	0	0	0	0	0
	1	19	20	17	18
	2	7	7	8	8
	3	4	3	5	4
Сумма баллов		45	43	48	46
3. Потеря полярности эпителиальных клеток	0	0	0	0	0
	1	14	15	14	13
	2	11	11	11	14
	3	5	4	5	3
Сумма баллов		51	49	51	50
4. Увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения	0	0	0	0	0
	1	23	22	24	25
	2	6	6	5	5
	3	1	2	1	0
Сумма баллов		38	40	37	35
5. Наличие клеток с ядерной гиперхромазией	0	0	0	0	0
	1	24	23	24	24
	2	3	5	5	6
	3	3	2	1	0
Сумма баллов		39	39	37	36
6. Увеличение числа клеток с нормальными и аномальными фигурами митоза	0	0	0	0	0
	1	25	24	26	23
	2	3	5	3	7
	3	2	1	1	0
Сумма баллов		37	37	35	37
7. Акантоз	0	0	0	0	0
	1	2	2	4	4
	2	18	16	14	15
	3	10	12	12	11
Сумма баллов		68	70	68	67
8. Дискератоз	0	0	0	0	0
	1	1	2	3	2
	2	22	20	19	21
	3	7	8	8	7

Окончание таблицы 3

Сумма баллов		66	66	65	65
9. Акантолиз	0	0	0	0	0
	1	3	2	1	5
	2	21	22	22	17
	3	6	6	7	8
Сумма баллов		63	64	66	63
10. Наличие воспалительной реакции в подслизистой основе	0	0	0	0	0
	1	22	21	20	24
	2	7	7	8	5
	3	1	2	2	1
Сумма баллов		39	41	42	37

Примечание: критерии 4, 5, 6 оценивались в 10 полях зрения на ув. 400.

Через 20 дней от начала лечения в группе 3 полное излечение по гистологическим данным наблюдалось у 9 крыс, а в группе 4 – у 21 животного за счет исчезновения или снижения степени выраженности всех морфологических признаков (табл. 5). Визуальное (клиническое) излечение было достигнуто у 8 животных в группе 3 и у 6 в группе 4 за счет исчезновения и снижения степени выраженности таких морфологических признаков, как акантоз, дискератоз и акантолиз. Кроме того, отмечалась положительная динамика и по морфологическим процессам, отражающим пролиферацию, изменение гистоархитектоники и анаплазию (в частности, базальноклеточная гиперплазия, беспорядочность расположения клеток с явлениями атипии, потеря полярности эпителиальных клеток, увеличение ядерно-цитоплазматического

Таблица 4
Морфологическая оценка СОРП животных через 10 дней после начала лечения
Table 4
Morphological assessment of the OM of animals 10 days after the start of treatment

Морфологический признак	Баллы	Степень выраженности морфологических изменений в группах животных			
		1 (n=30)	2 (n=30)	3 (n=30)	4 (n=30)
1. Расширение базального слоя МПЭ (базально-клеточная гиперплазия)	0	0	0	2	0
	1	5	5	3	1
	2	10	12	14	15
	3	15	14	11	14
Сумма баллов		70	71	64	73
2. Беспорядочность расположения клеток с явлениями атипии	0	0	0	2	0
	1	21	20	15	20
	2	6	7	8	6
	3	3	3	5	4
Сумма баллов		42	43	46	44
3. Потеря полярности эпителиальных клеток	0	0	0	2	1
	1	15	16	14	23
	2	11	10	9	3
	3	4	4	5	3
Сумма баллов		49	48	47	38

Окончание таблицы 4

4. Увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения	0	0	0	2	0
	1	22	23	23	25
	2	6	5	4	5
	3	2	2	1	0
Сумма баллов		40	39	34	35
5. Наличие клеток с ядерной гиперхромазией	0	0	0	3	1
	1	25	24	24	26
	2	3	4	2	3
	3	2	2	1	0
Сумма баллов		37	38	31	32
6. Увеличение числа клеток с нормальными и аномальными фигурами митоза	0	0	0	4	0
	1	26	24	23	25
	2	2	4	2	5
	3	2	2	1	0
Сумма баллов		36	38	30	35
7. Акантоз	0	0	0	4	2
	1	1	2	2	6
	2	19	17	12	12
	3	10	11	12	10
Сумма баллов		69	69	62*	60*
8. Дискератоз	0	0	0	6	7
	1	2	2	12	12
	2	22	20	8	8
	3	6	8	4	3
Сумма баллов		64	66	40*	37*
9. Акантолиз	0	0	0	7	9
	1	3	2	9	5
	2	21	21	11	12
	3	6	7	3	4
Сумма баллов		63	65	40*	41*
10. Наличие воспалительной реакции в подслизистой основе	0	0	0	23	2
	1	23	22	7	26
	2	6	6	0	2
	3	1	2	0	0
Сумма баллов		38	40	7*, ^Ω	30

Примечания: * Wilcoxon test, $p < 0,05$ от исходного уровня и/или результатов предыдущего исследования в данной группе; ^Ω Fisher, $p < 0,05$ между исследуемыми группами.

соотношения, наличие клеток с ядерной гиперхромазией, увеличение числа клеток с нормальными и аномальными фигурами митоза). В группах 1 и 2 динамика отсутствовала. По сравнению с предыдущим этапом лечения в группе 3 и 4 статистически достоверная динамика наблюдалась по всем морфологическим критериям. Результаты лечения по всем гистологическим параметрам (за исключением воспаления, где эффект был одинаков) в группе 4 оказались статистически достоверно более значимыми, чем при традиционной терапии (группа 3).

Через 30 дней от начала лечения клиническая и морфологическая картина в группах 3 и 4 в целом соответствовала изменениям, наблюдавшимся в этих группах через

Таблица 5
Морфологическая оценка СОПЖ животных через 20 дней после начала лечения
Table 5
Morphological assessment of the OM of animals 20 days after the start of treatment

Морфологический признак	Баллы	Степень выраженности морфологических изменений в группах животных			
		1 (n=30)	2 (n=30)	3 (n=30)	4 (n=30)
1. Расширение базального слоя МПЭ (базально-клеточная гиперплазия)	0	0	0	15	21
	1	7	8	12	6
	2	10	12	3	3
	3	13	10	0	0
Сумма баллов		66	62	18*	12*, ^Ω
2. Беспорядочность расположения клеток с явлениями атипии	0	0	0	17	21
	1	22	23	10	7
	2	5	4	3	2
	3	3	3	0	0
Сумма баллов		41	40	16*	11*, ^Ω
3. Потеря полярности эпителиальных клеток	0	0	0	16	22
	1	14	15	12	5
	2	14	13	2	3
	3	2	2	0	0
Сумма баллов		48	47	16*	11*
4. Увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения	0	0	0	17	18
	1	22	24	12	12
	2	5	3	1	0
	3	3	3	0	0
Сумма баллов		41	39	14*	12*
5. Наличие клеток с ядерной гиперхромазией	0	0	0	18	16
	1	24	25	12	12
	2	3	2	0	2
	3	3	3	0	0
Сумма баллов		39	42	12*	16*
6. Увеличение числа клеток с нормальными и аномальными фигурами митоза	0	0	0	18	23
	1	24	22	11	7
	2	3	5	1	0
	3	3	3	0	0
Сумма баллов		39	41	13*	7*, ^Ω
7. Акантоз	0	0	0	17	27
	1	2	2	10	3
	2	17	14	2	0
	3	11	14	1	0
Сумма баллов		69	72	17*	3*, ^Ω
8. Дискератоз	0	0	0	19	26
	1	3	2	10	4
	2	20	18	1	0
	3	7	10	0	0
Сумма баллов		64	68	12*	4*, ^Ω



Окончание таблицы 5

9. Акантолиз	0	0	0	19	22
	1	5	4	6	8
	2	20	21	4	0
	3	5	5	1	0
Сумма баллов		60	61	17*	8*, ^Ω
10. Наличие воспалительной реакции в подслизистой основе	0	0	0	29	25
	1	25	23	1	5
	2	4	4	0	0
	3	1	3	0	0
Сумма баллов		36	40	1*	5*, ^Ω

Примечания: * Wilcoxon test, $p < 0,05$ от исходного уровня и/или результатов предыдущего исследования в данной группе;
^Ω Fisher, $p < 0,05$ между исследуемыми группами.

месяц от начала лечения (табл. 6). Два случая визуального излечения (в основном за счет уменьшения акантоза и дискератоза) в группе 1 и один случай в группе 2, вероятно, связаны с регрессией изменений вследствие прекращения действия патогенных факторов и регенераторными процессами. В группе 4 отмечались максимально положительные результаты (эффект отсутствовал только в 2 случаях). В группах 3 и 4 отмечалось выраженное противовоспалительное действие проведенного лечения.

Таблица 6
Морфологическая оценка СОРП животных через 30 дней после начала лечения
Table 6
Morphological assessment of the OM of animals 30 days after the start of treatment

Морфологический признак	Баллы	Степень выраженности морфологических изменений в группах животных			
		1 (n=30)	2 (n=30)	3 (n=30)	4 (n=30)
1. Расширение базального слоя МПЭ (базально-клеточная гиперплазия)	0	0	0	16	23
	1	8	7	12	6
	2	10	11	2	1
	3	12	12	0	0
Сумма баллов		64	65	16	8*, ^Ω
2. Беспорядочность расположения клеток с явлениями атипии	0	0	0	16	24
	1	21	23	12	6
	2	7	5	2	0
	3	2	2	0	0
Сумма баллов		41	39	16	6*, ^Ω
3. Потеря полярности эпителиальных клеток	0	0	0	18	24
	1	15	14	10	6
	2	13	12	2	0
	3	2	4	0	0
Сумма баллов		47	50	14	6*, ^Ω
4. Увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения	0	0	0	18	24
	1	21	24	11	6
	2	6	3	1	0
	3	3	3	0	0

Окончание таблицы 6

Сумма баллов		42	39	13	6*, ^Ω
5. Наличие клеток с ядерной гиперхромазией	0	0	0	20	24
	1	23	24	9	5
	2	4	4	0	1
	3	3	2	1	0
Сумма баллов		40	38	12	7*, ^Ω
6. Увеличение числа клеток с нормальными и аномальными фигурами митоза	0	0	0	18	29
	1	23	22	12	1
	2	4	5	0	0
	3	3	3	0	0
Сумма баллов		40	41	12	1*, ^Ω
7. Акантоз	0	0	0	16	29
	1	1	2	11	1
	2	15	12	3	0
	3	14	16	0	0
Сумма баллов		73	74	17	1*, ^Ω
8. Дискератоз	0	0	0	19	29
	1	3	2	9	1
	2	19	17	2	0
	3	8	11	0	0
Сумма баллов		65	69	13	1*, ^Ω
9. Акантолиз	0	0	0	18	27
	1	5	4	7	3
	2	19	20	5	0
	3	6	6	0	0
Сумма баллов		61	62	17	3*, ^Ω
10. Наличие воспалительной реакции в подслизистой основе	0	0	0	29	29
	1	24	24	1	1
	2	4	5	0	0
	3	2	1	0	0
Сумма баллов		38	37	1	1*

Примечания: * Wilcoxon test, $p < 0,05$ от исходного уровня и/или результатов предыдущего исследования в данной группе; ^Ω Fisher, $p < 0,05$ между исследуемыми группами.

Таким образом, эффективность предлагаемого метода лечения была выше, чем при традиционной терапии. При этом положительный эффект лечения касался всех морфологических изменений (дистрофических, воспалительных, диспластических и пролиферативных), в то время как традиционное лечение показало эффективность в отношении уменьшения степени выраженности воспалительных и дистрофических процессов.

■ ВЫВОДЫ

Отмечена нормализация морфологических изменений (дистрофических, воспалительных, диспластических и пролиферативных) под влиянием местного и системного применения рибофлавина и последовательного воздействия лазерами фиолетового и красного спектра света с рабочими длинами волн 405 ± 5 и 650 ± 5 нм соответственно.

Предлагаемый метод лечения можно рекомендовать пациентам с ПЗСОРП как простой, хорошо переносимый (минимальный риск развития осложнений и побочных реакций), недорогой, эффективный, реализуемый в условиях стоматологической поликлиники.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Chiang W.F., Liu S.Y., Lin J.F., Chiu S.F., Gou S.B., Chiou C.T., Chang C.H. (2020) Malignant development in patients with oral potentially malignant disorders detected through nationwide screening: outcomes of 5-year follow-up at a single hospital. *Head Neck*, vol. 42, no 1, pp. 67–76. doi: 10.1002/hed.25973
- Warnakulasuriya S. (2018) Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, vol. 125, no 6, pp. 582–590. doi: 10.1016/j.oooo.2018.03.011
- Parakh M.K., Ulaganambi S., Ashifa N., Premkumar R., Jain A.L. (2020) Oral potentially malignant disorders: clinical diagnosis and current screening aids: a narrative review. *Eur J Cancer Prev*, vol. 29, no 1, pp. 65–72.
- Karpuk N., Rubnikov S., Boginskiy O. Vozmozhnosti citologicheskoy diagnostiki v dispanserizatsii pacientov s predopuholevymi zabolevanijami slizistoy obolochki rta s uchetom ih rasprostranennosti v Vitebskoj oblasti s 2014 po 2019 gg. [Possibilities of cytological diagnostics in clinical examination of patients with precancerous diseases of the oral mucosa, taking into account their prevalence in the Vitebsk region from 2014 to 2019]. *Vestn. VGMU*, vol. 19, no 2, pp. 78–88.
- Farah C.S., Fox S.A. (2019) Dysplastic oral leukoplakia is molecularly distinct from leukoplakia without dysplasia. *Oral Dis*, vol. 25, no 7, pp. 1715–1723. doi: 10.1111/odi.13156
- Yang S.W., Lee Y.S., Chang L.C., Yang C.H., Luo C.M., Wu P.W. (2021) Oral tongue leukoplakia: analysis of clinicopathological characteristics, treatment outcomes, and factors related to recurrence and malignant transformation. *Clin Oral Investig*, vol. 25, no 6, pp. 4045–4058. doi: 10.1007/s00784-020-03735-1
- Karpuk I. (2010) Diagnostika allergii na mestnye anestetiki v reakcii allergeninducirovannogo povrezhdenija lejkoцитov [Diagnosis of allergy to local anesthetics in the reaction of allergen-induced damage to leukocytes]. *Vestn. VGMU*, vol. 9, no 1, pp. 70–75.
- Karpuk I., Novikov D. (2016) Vyjavlenie allergii i giperchuvstvitel'nosti k soljam metallov putem opredelenija urovnja ionov kalija v rotovoj zhidkosti [Detection of allergies and hypersensitivity to metal salts by determining the level of potassium ions in the oral fluid]. *Immunopatologija, allergologija, infektologija*, no 3, pp. 21–30.
- Karpuk I. (2014) Immunopatologija u pacientov s ortopedicheskimi konstrukcijami v polosti rta [Immunopathology in patients with orthopedic constructions in the oral cavity]. *Vestn. VGMU*, vol. 13, no 4, pp. 29–35.
- De Vicente J.C., Donate-Perez Del Molino P., Rodrigo J.P., Allonca E., Hermida-Prado F., Granda-Diaz R., Rodriguez Santamarta T., Garcia-Pedrero J.M. (2019) SOX2 expression is an independent predictor of oral cancer progression. *J Clin Med*, vol. 8, no 10, pp. 1744.
- Karpuk I., Novikov D. (2017) Uvelichenie urovnja mieloperoksidazy v rotovoj zhidkosti posle oral'no-bukkal'noj provokatsii s komponentami stomatologicheskikh materialov u pacientov s ih neperenosimost'ju [An increase in the level of myeloperoxidase in the oral fluid after oral-buccal provocation with the components of dental materials in patients with their intolerance]. *Ros. immunol. Zhurn*, vol. 11, no 4, pp. 57–64.
- Karpuk I. (2017) Spektr antitel k kandidam i akrilu u pacientov s protezным stomatitom [Spectrum of antibodies to candida and acrylic in patients with denture stomatitis]. *Sovremnaja stomatologija*, no 2, pp. 73–76.
- Jurczyszyn K., Kozakiewicz M. (2020) Application of Texture and Fractal Dimension Analysis to Estimate Effectiveness of Oral Leukoplakia Treatment Using an Er:YAG Laser-A Prospective Study. *Materials (Basel)*, vol. 13, no 16, pp. 3614. doi: 10.3390/ma13163614
- Gabric D., Brailo V., Ivek A., Krpan K., Matulić N., Vrdoljak D.V., Baraba A., Vučićević Boras V. (2019) Evaluation of innovative digitally controlled eryarg laser in surgical treatment of oral leukoplakia – a preliminary study. *Acta Clin Croat*, vol. 58, no 4, pp. 615–620. doi: 10.20471/acc.2019.58.04.07
- Lin L., Song C., Wei Z., Zou H., Han S., Cao Z., Zhang X., Zhang G., Ran J., Cai Y., Han W. (2022) Multifunctional photodynamic/photothermal nanoagents for the treatment of oral leukoplakia. *J Nanobiotechnology*, vol. 20, no 1, pp. 106. doi: 10.1186/s12951-022-01310-2
- Li Y., Wang B., Zheng S., He Y. (2019) Photodynamic therapy in the treatment of oral leukoplakia: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 25, pp. 17–22. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.10.023
- Istomin Yu., Artem'eva T., Tserkovskii D. (2016) Fotodinamicheskaja terapija lejkoplakii slizistoj obolochki polosti rta s fotosensibilizatorom fotolon [Photodynamic therapy of leukoplakia of the oral mucosa with the photolon photosensitizer]. *Biomedical Photonics*, vol. 5, no 2, pp. 13–20.
- Sholina N., Akasov R., Khochenkov D., Generalova A., Semchishen V., Khaidukov E. (2019) Fotodinamicheskaja terapija solidnyh opuholej in vitro i tivo s primeneniem kombinacii riboflavina i nanorazmernih apkonvertirujushhijh fosforov [Photodynamic therapy of solid tumors in vitro and in vivo using a combination of riboflavin and nanosized upconverting phosphors]. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny*, vol. 47, no 7, pp. 647–653. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-057
- Al Deeb L. (2022) Disinfection of caries-affected dentin using activated vitamin B2 and diode laser with total-etch technique. An assessment of adhesive bond. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 39, pp. 102970. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102970
- Rubnikov S., Fomin N. (2010) *Lazerno-opticheskie metody diagnostiki i terapii v stomatologii* [Laser-optical methods of diagnostics and therapy in dentistry]. Minsk: ITMO im. AV Ljnkova NAN Belarusi, pp. 45–56. (in Russian)
- Rubnikov S. (2012) Lazerno-opticheskaja diagnostika boleznij periodonta i obosnovanie metodov ih lechenija [Laser-optical diagnostics of periodontal diseases and substantiation of their treatment methods]. *Stomatolog. Minsk*, no 1, pp. 15–19. (in Russian)
- Dedova L., Solomevich A., Denisova Yu., Rubnikov S. (2018) Principy sovremennoj fizioterapii u pacientov s boleznijami periodonta [Principles of modern physiotherapy in patients with periodontal diseases]. *Stomatolog. Minsk*, no 3, pp. 32–37.
- Rubnikov S. (2013) Kompleksnoe lechenie boleznij periodonta i zubocheljustnyh anomalij s primeneniem novoj lazerno-opticheskoy diagnostiki [Comprehensive treatment of periodontal diseases and dentoalveolar anomalies using new laser-optical diagnostics]. *Innovatsionnye tekhnologii v meditsine*, no 1, pp. 82–89.
- Ob utverzhenii klinicheskikh protokolov stomatologicheskogo profila [On the approval of clinical protocols of the dental profile]: Prikaz MZ RB, 26 dek. 2011, № 1245. Available at: <https://bymed.top/doc/by-protocols> (accessed 21 Feb 2020).
- Marchenko S. (ed.) (2016) *Gosudarstvennaja farmakopeja Respubliki Belarus' (GF RB II). V 2 t. T. 2: Kontrol' kachestva substancij dlja farmacevicheskogo ispol'zovanija i lekarstvennogo razitel'nogo syr'ja* [State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus (GF RB II). In 2 volumes. V.2 Quality control of substances for pharmaceutical use and medicinal plant materials]. Molodechno: tip. «Pobeda», 1368 p.