

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.716.8 = 018.4-089.844-003.9:615.849.19]-092.9

Тарасенко С.В.¹, Вавилова Т.П.², Тарасенко И.В.³, Морозова Е.А.¹, Гуторова А.М.¹

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЕМ ER:YAG ЛАЗЕРА

¹Кафедра хирургической стоматологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, г. Москва; ²кафедра биологической химии ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, 127206, г. Москва; ³Инновационный стоматологический центр «Павлово», 143581, Московская обл., Истринский р-н, д. Новинки

Представлены результаты клинико-экспериментальных и лабораторных исследований регенерации минерализованных и мягких тканей после воздействия излучением Er:YAG лазера с длиной волны 2940 нм у лабораторных животных, а также по результатам хирургического лечения пациентов с заболеваниями челюстно-лицевой области. Анализ результатов исследования показал интраоперационное и послеоперационное преимущества применения лазерных технологий, позитивное влияние лазерного излучения на регенерацию тканей, так как при этом быстрее проходит процесс заживления раны и восстановление костного дефекта. Клинические данные соответствуют данным лучевых, гистологических и биохимических методов исследования.

Ключевые слова: заболевания челюстно-лицевой области; эрбиевый лазер; регенерация; смешанная слюна.

Для цитирования: Тарасенко С.В., Вавилова Т.П., Тарасенко И.В., Морозова Е.А., Гуторова А.М. Оптимизация регенерации минерализованных и мягких тканей челюстно-лицевой области после воздействия излучением Er:YAG лазера. Российский стоматологический журнал. 2016; 20 (2): 66-73. DOI 10.18821/1728—2802 2016; 20 (2): 66-73

Tarasenko S.V.¹, Vavilova T.P.², Tarasenko I.V.³, Morozova E.A.¹, Gutorova A.M.¹

OPTIMIZATION OF THE REGENERATION OF MINERALIZED AND SOFT TISSUES OF THE MAXILLO-LAVOY REGION AFTER EXPOSURE TO RADIATION OF ER:YAG LASER

¹ Department surgical dentistry, I.M. Sechenov First Moscow state medical University Ministry of health of Russia, 119991, Moscow, Russia; ² A.I. Evdokimov Department of biological chemistry University, 127473, Moscow; ³Innovative dental centre «Pavlovo», 143581, Moscow region, Istra district, Novinki

Presents the results of clinical and experimental and laboratory studies of regeneration of mineralized and soft tissues after exposure to radiation of Er: YAG laser with a wavelength of 2940 nm in laboratory animals, and the results of surgical treatment of patients with disease of the maxillofacial area. Analysis of study results showed that intraoperative and postoperative benefits of laser technology, the positive influence of laser radiation on the regeneration of tissues, as this is quicker process of wound healing and restoration of the bone defect. Clinical data correspond to the data of radiation, histological and biochemical methods.

Key words: diseases of the maxillofacial area; erbium laser; regeneration; mixed saliva.

For citation: Tarasenko S.V., Vavilova T.P., Tarasenko I.V., Morozova E.A., Gutorova A.M. Optimization of the regeneration of mineralized and soft tissues of the maxillo-lavoy region after exposure to radiation of Er:YAG laser. Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal. 2016; 20 (2): 66-73. DOI 10.18821/1728—2802 2016; 20 (2): 66-73

For correspondence: Tarasenko Svetlana Viktorovna, dr. med. sci., Professor, head of the Department surgical dentistry of I.M. Sechenov First Moscow state medical University health Ministry of Russia, prof_tarasenko@rambler.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 01.11.15

Accepted 28.12.15

Актуальность. Восстановление костной и мягких тканей челюстно-лицевой области является весьма актуальной проблемой, сложность которой заключается в том, что после оперативных вмешательств могут развиваться воспалительные осложнения, формироваться грубые рубцы и невосстанавливающиеся послеоперационные костные дефекты челюстей [1—4]. Поэтому возникает необходимость поиска методов хирургического лечения, которые в меньшей степени способствуют риску развития послеоперационных осложнений, а с учетом накопленных знаний о регенерации костной

и мягких тканей челюстно-лицевой области и достижений в области высоких технологий существенно повысили бы эффективность хирургического лечения пациентов за счет оптимизации регенерации тканей.

С этой целью нами предпринята попытка изыскания альтернативных хирургическим инструментам методик, позволяющих обеспечить пациентам комфортные условия во время проведения операции и в послеоперационном периоде, позитивно влияющих на качество и скорость регенерации тканей. В связи с этим был осуществлен маркетинг выпускаемого на медицинский рынок современного оборудования, применяемого в хирургии. Многоплановый поиск позволил сделать выбор в пользу лазерных технологий, которые являются оптимальными с точки зрения рациональных, эстетических и технологических позиций.

На сегодняшний день лазерная хирургия является одним

Для корреспонденции: Тарасенко Светлана Викторовна, д-р мед. наук, проф., зав. каф. хирургической стоматологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, E-mail: prof_tarasenko@rambler.ru

из самых совершенных достижений мировой медицины, которая позволяет производить операции с меньшей травматичностью, кровотечением и болезненностью при хорошем обзоре операционного поля [4—6]. Лазерное воздействие основано на использовании свойств электромагнитных излучений, квантовых процессов и их влиянии на волновые информационные свойства живых клеток. В отличие от химических препаратов медицинские лазеры не дают нежелательных побочных эффектов и оказывают избирательное, селективное воздействие на ткани человеческого организма [5—8].

В настоящее время в стоматологии широко используют эрбиевый (Er:YAG), эрбиево-хромовый (Er:YSGG) и углекислый (CO₂) лазеры, длины волн которых соответствуют главным пикам поглощения водой. В отношении последнего проводились многочисленные клинические и экспериментальные исследования, которые позволили определить спектр и широту воздействия на различные ткани [4]. Что же касается изучения влияния излучения эрбиевого лазера на минерализованные и мягкие ткани, то они немногочисленные, но весьма обнадеживающие [3].

Материал и методы

В нашем исследовании объединены и обобщены результаты экспериментальных и клинических исследований по изучению влияния излучения эрбиевого лазера на регенерацию костной и мягких тканей. При этом было уделено внимание фундаментальным основам регенерации эпителиальной и соединительной тканей, составляющих основной объем тканей челюстно-лицевой области. В экспериментах на 392 животных (360 крысах и 32 кроликах) изучено действие эрбиевого лазера с различными параметрами излучения на костную ткань и слизистую оболочку полости рта. Животным проводили дезэпителизацию слизистой оболочки щеки и формирование костного дефекта как с помощью стандартного набора хирургических инструментов (скальпель, физиодиспенсер), так и эрбиевого лазера. Вторым направлением нашего исследования явилось изучение влияния излучения эрбиевого лазера на процессы репарации у 675 пациентов обоего пола, 370 из которых провели лазерные операции по поводу стоматологических заболеваний. Особенности заживления раневой поверхности костной и мягких тканей оценивали по макроскопическим, морфологическим, биохимическим и рентгенологическим критериям.

Результаты исследования

В группах животных, у которых дефект в костной ткани формировали с помощью излучения эрбиевого лазера в режиме абляции очень короткими (vsp) и короткими (sp) импульсами, отмечали сходную патоморфологическую картину. Во все сроки наблюдения процессы в зоне травмы костей согласуются с общими процессами остеогенеза, но в отличие от травмы, вызванной вращающимся инструментом, отмечается более быстрое очищение зоны травмы и ранняя активизация остеобластических элементов (рис. 1 см. на вклейке). На 40-е сутки после механической травмы определяли анастомозирующие костные балочки, в отдельных случаях встречались остатки волокнистой соединительной ткани, расположенные в центральной зоне дефекта. Клеточные элементы были представлены фибробластами и небольшим количеством макрофагов (см. рис. 1, а).

После нанесения травмы излучением эрбиевого лазера в обоих режимах у подопытных животных наблюдалось полное восстановление кости в зоне дефекта с некоторым преимуществом при лазерном излучении очень короткими импульсами. Костные балочки новообразованной кости спаяны сохранившимися костными структурами, и границы между

ними слабо различимы. Регенерат представлен типичной пластинчатой костной тканью (см. рис. 1, б).

Следует также отметить, что после лазерного воздействия в этой зоне микротрещин было в 6 раз меньше, отсутствовали в отличие от последствия механической травмы признаки деструкции костной ткани.

В опытах на кроликах было показано, что излучение эрбиевого лазера в режиме абляции не вызывало термического повреждения кортикального слоя костной ткани и способствовало быстрому формированию интермедиарной костной мозоли в зоне дефекта. В то же время при создании костного дефекта с помощью физиодиспенсера регенерация костной ткани осуществлялась медленнее за счет всех трех видов костной мозоли — эндостальной, периостальной и интермедиарной (рис. 2).

Через 120 сут отмечали полное замещение дефекта костной тканью, а в группе животных, у которых остеотомию выполняли физиодиспенсером, определялось восстановление костной ткани, но без полного формирования кортикального слоя.

Известно, что процессы ремоделирования костной ткани в условиях физиологической перестройки и репаративного остеогенеза тесно связаны с факторами роста. В нашем исследовании регенерация костной ткани у животных после перфорации эпифиза бедренной кости крыс излучением эрбиевого лазера и ротационным механическим инструментом была изучена в динамике репарации по содержанию основного фактора роста фибробластов-β (oФРФ-β), транс-

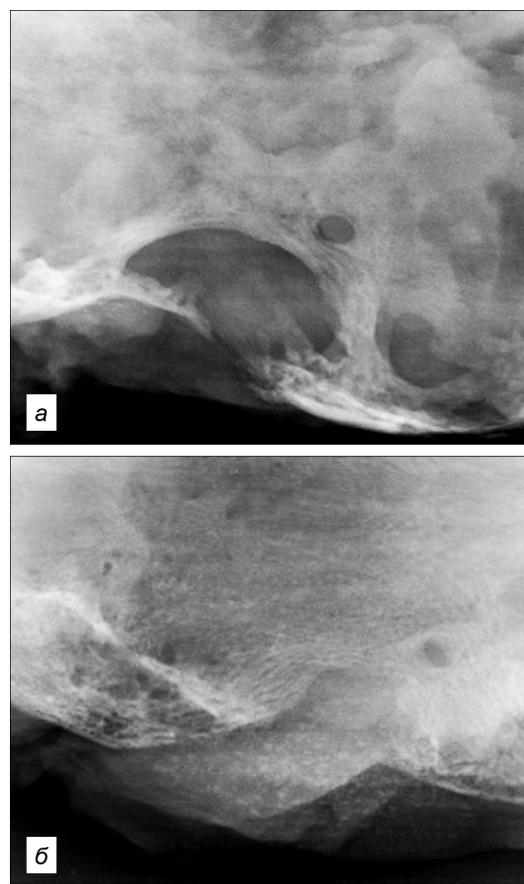


Рис. 2. Микрофокусная рентгенограмма с 20-кратным увеличением изображения после создания дефекта нижней челюсти кролика.

а – эрбиевым лазером, б – физиодиспенсером.

Таблица 1. Исследование показателей регенерации костной ткани бедра крыс в динамике ($M \pm m$)

Показатель (нг/мг ткани)	Группа	Срок регенерации костной ткани					
		1	5	10	15	20	40
оФРФ- β	Физиодисп.	118 \pm 12,8	105 \pm 11,8	91,1 \pm 8,25	89,1 \pm 7,45	89,3 \pm 5,20	78,0 \pm 1,37
	Лазер	87,9 \pm 10,4*	121 \pm 23,7	93,5 \pm 4,21	78,1 \pm 3,88	112 \pm 21,4	92,3 \pm 6,71*
ТФР-1 β	Физиодисп.	6,56 \pm 1,95	3,98 \pm 0,84	3,43 \pm 0,69	2,88 \pm 0,29	2,68 \pm 0,51	2,31 \pm 0,29
	Лазер	3,39 \pm 0,36	3,19 \pm 0,32	3,61 \pm 0,76	3,83 \pm 0,71	3,41 \pm 0,57	1,97 \pm 0,18
ИФР-1	Физиодисп.	2,10 \pm 1,06	0,42 \pm 0,22	1,29 \pm 0,87	1,16 \pm 0,74	4,29 \pm 1,59	4,90 \pm 1,75
	Лазер	5,45 \pm 3,74	3,93 \pm 1,06*	2,68 \pm 0,92	0,29 \pm 0,19	3,51 \pm 1,43	7,80 \pm 1,86
Остеокальцин	Физиодисп.	14,1 \pm 5,39	18,1 \pm 6,09	16,1 \pm 1,12	14,0 \pm 2,42	6,13 \pm 1,80	4,43 \pm 1,67
	Лазер	18,1 \pm 6,68	16,1 \pm 5,27	4,83 \pm 1,71*	7,66 \pm 1,10*	6,28 \pm 1,70	4,83 \pm 0,93
ЩФ	Физиодисп.	1,84 \pm 0,18	5,15 \pm 1,00	3,37 \pm 0,17	3,11 \pm 0,52	1,77 \pm 0,31	2,99 \pm 0,17
	Лазер	1,58 \pm 0,15	1,67 \pm 0,32*	2,40 \pm 0,52	3,55 \pm 0,29	1,13 \pm 0,28	1,49 \pm 0,33*

Примечание. Здесь и в табл. 3: * $p < 0,05$ — достоверность отличий при сопоставлении 1-й и 2-й групп животных в динамике.

формирующего фактора роста-1 β (ТФР-1 β) и инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) (табл. 1).

Регенерация поврежденных участков костной ткани происходит при тесном взаимодействии фибробластов с другими клетками. Фибробласты скапливаются в месте повреждения, активно дифференцируются и, кроме синтеза коллагена, способны вырабатывать такие факторы роста, как тромбоцитарный, трансформирующий-1 β , фибробластов и эндотелиальный, синтезировать и другие белки межклеточного матрикса [8].

Этим определяется высокое количество оФРФ- β на 1-й и 5-й день после травмы вращающим инструментом, и только к 40-му дню опыта фиброгенез становится менее активным. В то же время формирование межклеточного матрикса невозможно без увеличения количества клеток, дифференцировку и быстрый рост которых обеспечивает инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1). Также предполагается, что ИФР-1 участвует в формировании минеральной фазы, необходимой для восстановления зоны повреждения. С этих позиций, вероятно, можно объяснить волнообразное изменение количества ИФР-1 во все сроки опыта. На пер-

вый день после механической травмы данный фактор роста участвует в росте и дифференцировке костных клеток, а на 20-й и 40-й дни он необходим для процессов минерализации. Однако после воздействия эрбиевого лазера не наблюдалось существенных отличий до 40-го дня эксперимента в количестве выделяемого оФРФ- β , что, возможно, обусловлено коагуляцией кровеносных сосудов и отсроченной миграцией клеток крови. В то же время имеющееся на 40-й день более высокое содержание оФРФ- β наряду с повышенным уровнем ИФР-1 можно расценивать как процесс активного ангиогенеза, деления клеток и формирования не только белковой матрицы, но и минеральной фазы.

Трансформирующий фактор роста-1 β , являющийся мощным иммунодепрессантом и индуктором синтеза белков межклеточного матрикса, играет важную роль. Наши результаты показывают, что именно в первые сутки после травмы вращающимся инструментом наблюдалось наибольшее количество этого фактора роста, и его уменьшение в последующем объясняется снижением скорости формирования межклеточного матрикса. В группах животных, у которых костный дефект вызывали излучением эрбиево-

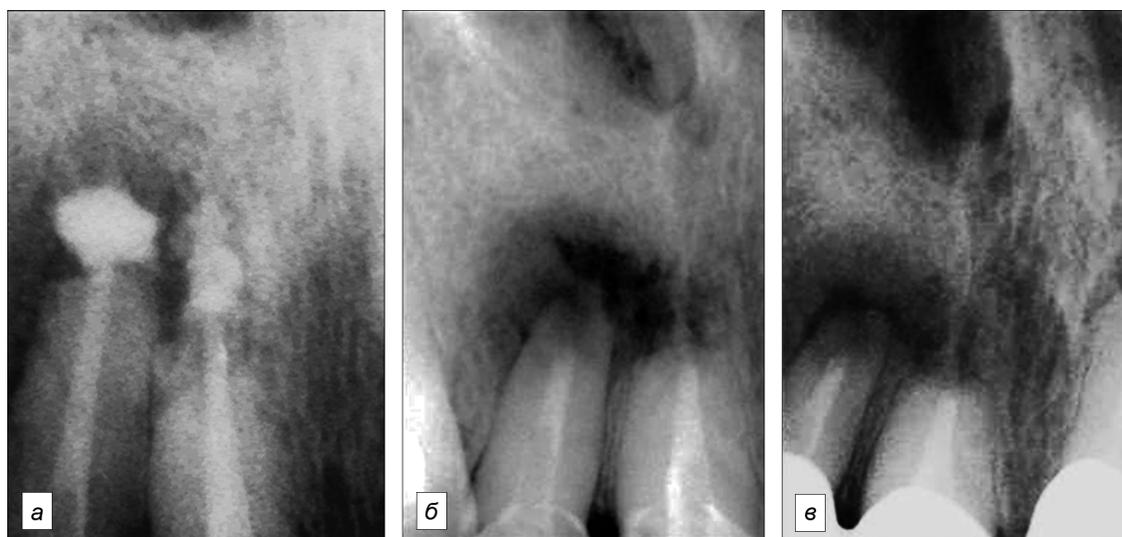


Рис. 3. Лазерная цистэктомия на верхней челюсти.

а – до операции, б – после операции эрбиевым лазером, е – через 6 мес после операции.

Таблица 2. Результаты оценки регенерации костной ткани с денситометрическим анализом плотности костной ткани (усл. ед.) по данным микрофокусной рентгенографии

Срок регенерации костной ткани	Группа исследования	
	эрбиевый лазер	традиционный метод
Через 1 мес	170—180	180—190
Через 3 мес	190—198	150—170
Через 6 мес	180—200	155—180
Через 12 мес	180—200	180—190

го лазера, наблюдалось отсутствие отличий в содержании ТФР-1 β во все сроки эксперимента, что, по всей видимости, следует рассматривать как активное формирование межклеточного матрикса в ране.

Образование костной ткани характеризуется секрецией остеобластами основного компонента межклеточного матрикса кости — коллагеновых белков, а также щелочной фосфатазы, остеокальцина и других белков, участвующих в минерализации костного остова [9].

Сходные результаты получены и при клинических исследованиях, согласно которым после лазерного воздействия регенерация и формирование зрелой костной ткани в области послеоперационного костного дефекта в челюстных костях проходит в более сжатые сроки, чем после воздействия вращающимся инструментом (рис. 3).

Неоднородность заполнения зоны костного дефекта новообразованной тканью после лазерной операции также подтверждена результатами микрофокусной рентгенографии с денситометрией, которые показали, что плотность костной ткани через 1 мес после операции цистэктомии была ниже, чем после воздействия стандартных хирургических инструментов. Однако уже через 3 мес после воздействия излучения эрбиевого лазера плотность костной ткани увеличивалась (табл. 2). Тогда как в группах пациентов, которых оперировали стандартными хирургическими инструментами, вначале плотность костной ткани в зоне дефекта (через 1 мес после операции) была выше, чем в группе оперированных лазером, а через 3 мес значительно ниже. Она достигала нормальных величин только на 12-й месяц заживления костного дефекта.

Таким образом, наши исследования показали особенно-

сти регенерации костной ткани после лазерного воздействия в виде начального восстановления структуры по периферии с постепенным сужением к центру, что приводит к сокращению сроков репаративного остеогенеза. После воздействия стандартными хирургическими инструментами процесс регенерации кости протекает более равномерно по всей площади дефекта, но медленнее.

Процессы репарации мягких тканей существенно отличаются от регенерации костной ткани. Мягкие ткани челюстно-лицевой области в основном представлены соединительнотканым матриксом и эпителиальной выстилкой, что и определяет особенность их реакции на повреждающие факторы. В эксперименте на животных изучали морфологические и метаболические изменения в слизистой оболочке щеки после воздействия излучения эрбиевого лазера в режиме абляции длинными импульсами (Ip). В клинической практике была дана оценка заживления мягких тканей полости рта по визуальным характеристикам, а также по результатам гистологического, биохимического и иммунологического методов исследования.

У лабораторных животных заживление дефекта слизистой оболочки щеки после лазерного воздействия происходило быстрее (рис. 4 см. на вкл.).

Отличительной особенностью ран, нанесенных лазером, является слабая воспалительная реакция со стороны окружающих тканей на появление слоя асептического коагуляционного некроза. В ранах, нанесенных скальпелем, быстрее развивалось воспаление: в первые часы нейтрофилы образовывали лейкоцитарный вал, а по краям раны формировались гематомы и развивался выраженный коллатеральный отек. В ране, нанесенной лазером, отек и лейкоцитарная инфильтрация были выражены слабее. Этому, по всей вероятности, способствовал термический эффект лазерного излучения, который вызывал тромбоз мелких сосудов, дегидратацию и уплотнение коагулированной ткани. Белки таких тканей с трудом гидролизуются под действием протеиназ и не могут быстро освобождать vasoактивные вещества.

Гистологическая картина раневых дефектов, сформированных лазером, через 15 сут характеризовалась тем, что эпителий ран уже мало отличается от интактного эпителия по толщине и степени дифференцировки. Под эпителием располагается фиброзно-рубцовая ткань, состоящая из рыхлых коллагеновых пучков с умеренным количеством фибробластов и минимальным содержанием лимфоцитов и

Таблица 3. Исследование показателей, отражающих заживление слизистой оболочки щеки крыс в динамике ($M \pm m$)

Показатель (пг/мг ткани)	Группа	Срок регенерации костной ткани					
		контрольная	1	2	3	5	7
ИЛ-1 β	Скальпель	0,41 \pm 0,06	0,58 \pm 0,23	0,46 \pm 0,12	0,50 \pm 0,09	0,31 \pm 0,07	0,37 \pm 0,08
	Лазер		0,33 \pm 0,06	0,95 \pm 0,24*	0,38 \pm 0,10	0,50 \pm 0,09	0,42 \pm 0,06
ИЛ-4	Скальпель	0	13,8 \pm 1,84	18,6 \pm 3,57	18,0 \pm 1,31	20,0 \pm 2,80	15,4 \pm 1,46
	Лазер		5,98 \pm 1,65*	11,9 \pm 2,06	12,0 \pm 1,96	15,5 \pm 1,54	15,2 \pm 2,00
ИЛ-6	Скальпель	4,00 \pm 0,25	3,37 \pm 0,82	3,22 \pm 0,46	3,49 \pm 0,26	3,26 \pm 0,45	3,07 \pm 0,58
	Лазер		4,12 \pm 0,20	5,50 \pm 0,10	2,85 \pm 0,34	3,93 \pm 0,31	3,80 \pm 0,29
ИЛ-10	Скальпель	0	76,5 \pm 21,4	42,3 \pm 10,1	18,0 \pm 0,93	20,6 \pm 4,28	30,0 \pm 4,83
	Лазер		21,8 \pm 4,22*	32,6 \pm 5,55	30,0 \pm 3,40*	34,2 \pm 4,11	32,1 \pm 3,51
проММП-1	Скальпель	0,25 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,21 \pm 0,008	0,22 \pm 0,008	0,24 \pm 0,008
	Лазер		0,21 \pm 0,008	0,23 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02
ТИМП-1	Скальпель	12,7 \pm 1,28	8,16 \pm 2,25	8,78 \pm 3,50	8,64 \pm 1,64	6,36 \pm 0,96	6,26 \pm 0,90
	Лазер		5,52 \pm 0,80*	8,24 \pm 2,24	5,63 \pm 1,63*	6,26 \pm 0,79	8,64 \pm 1,00

макрофагов (см. рис. 4, а на вкл.). Все это свидетельствует о постепенной инволюции рубцовой ткани, которая уже мало отличается от интактной ткани слизистой оболочки. В скальпельном дефекте эпителий гипертрофирован по сравнению с интактным эпителием, но уже хорошо дифференцирован. Под эпителием еще сохраняется грануляционная ткань в стадии фиброобразования, однако там еще не закончилась трансформация в рубцово-фиброзную ткань (см. рис. 4, б на вкл.). Об этом свидетельствует повышенное количество сосудов и фибробластов, а также остающаяся лимфомакрофагальная инфильтрация.

Известно, что процессы деструкции и пролиферации, протекающие после повреждения тканей, находятся под сложным гуморальным контролем различных цитокинов, в том числе интерлейкинов, которые регулируют действие моноцитов, гранулоцитов и макрофагов, участвующих в очищении раны для последующей ее регенерации. Ряд цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-6, ФНО α обладают мощной провоспалительной и катаболической активностью. Показано, что ИЛ-1 β играет преобладающую роль в деструкции тканей, активирует синтез Т-лимфоцитов, что свидетельствует об активации иммунного ответа на повреждение целостности ткани [10].

В то же время противовоспалительный цитокин ИЛ-4 ингибирует развитие Т-клеток воспаления, так как блокирует выработку ИЛ-1 β . К противовоспалительным цитокинам также относятся и ИЛ-10. Эти белки принимают активное участие в процессах регенерации тканей при повреждении [9]. Проведенное нами исследование показало, что в ране, сформированной излучением эрбиевого лазера, пик воспалительной реакции наблюдался на 2-е сутки, а в последующие сутки заживления начинал стихать (табл. 3). Под действием режущего инструмента реакция воспаления в ране начинается уже в 1-е сутки, и воспалительный процесс протекает более интенсивно.

Повреждение тканей характеризуется активацией свободно-радикальных процессов с образованием супероксиданионов и других соединений. Для ферментативных антиоксидантов характерны высокая специфичность, строго определенная органная и клеточная локализация, а также использование в активном центре ионов металлов Cu, Fe, Mn, Zn, Se [9, 11]. Проведенные нами эксперименты по изучению особенности антиоксидантной защиты в слизистой оболочке щеки крыс после воздействия на них излучения эрбиевого лазера показали, что во все сроки заживления раны содержание Cu/Zn-СОД и активность СОД существенно не отличались как от значений животных контрольной группы, так и группы животных, которым дезэпителизацию проводили скальпелем. Полученные результаты позволили сделать вывод, что в ране слизистой оболочки щеки крыс независимо от способа ее нанесения системы генерации свободных радикалов и антиоксидантной защиты в клетках эпителия находятся в динамическом равновесии.

Восстановление и замещение поврежденных тканей начинается с формирования фибробластического барьера. Хемотаксис, активация и пролиферация фибробластов осуществляются под воздействием факторов роста фибробластов, тромбоцитов, β -трансформирующего некроза опухоли, интерлейкина-1 β , а также кининов, тромбина и других регуляторных белков и пептидов. Слаженное взаимодействие регуляторных пептидов в зоне раневого дефекта в конечном итоге заканчивается формированием репаративного рубца.

Наши исследования показали, что в области раны слизистой оболочки щеки крыс, сформированной излучением эрбиевого лазера, на 2-е сутки наблюдался активный всплеск синтеза оФРФ- β , который сохранялся и на 3-и сутки заживления раны (табл. 4).

Уже на 5-е сутки количество оФРФ- β сопоставимо с данными контроля, что свидетельствует о завершении эпители-

зации раневой поверхности в эти сроки. Полученные результаты отражают быстрое протекание фазы грануляции после воздействия лазера, в то время как после нанесения раны режущим инструментом длительность образований грануляций составила от 2 до 5 сут и только на 7-е сутки количество оФРФ- β как после воздействия лазера, так и скальпеля приближалось к значениям контрольной группы.

Пролиферативная фаза заживления раны характеризуется разрастанием соединительнотканного матрикса, которое регулируется ИЛ-1 β . Этот цитокин также контролирует активность матриксной металлопротеиназы-1 (ММП-1), участвующей в разрушении белковых компонентов межклеточного матрикса [7, 10]. В условиях нормы в тканях содержится незначительное количество активных ММП, и их активность зависит от присутствия тканевых белковых ингибиторов (ТИМП) в окружающей среде. В живом организме для поддержания гомеостаза соблюдается четкое равновесие между активаторами протеолиза и их ингибиторами [9, 11]. Это позволяет рассматривать протеиназы не только в качестве деструктивных ферментов, обеспечивающих катаболизм белков и образование пептидов и аминокислот, но и основных участников регуляторных процессов, отвечающих за сохранность клеточного протеома. В раневом дефекте, вызванном излучением эрбиевого лазера, на 2-е сутки заживления раны наблюдается увеличение количества проММП-1 и ТИМП-1 на фоне роста количества ИЛ-1 β и ИЛ-6, которые постепенно снижаются в последующие сроки, что значительно отличается от показателей, полученных при нанесении раны скальпелем. Выявленные изменения в системе протеиназа — ингибитор совпадают с данными морфологических исследований, показывающих, что после воздействия эрбиевого лазера на ранних этапах заживления дефекта наблюдается оптимальное очищение раны и течение репаративных процессов. Таким образом, заживление раны, нанесенной на слизистую оболочку щеки лазером, происходит быстрее, чем заживление раны, нанесенной скальпелем.

Это совпадает с результатами клинических исследований. Объективная оценка раневого процесса показала, что после нанесения раны скальпелем фибропластические процессы минимальны в течение первых 4—6 сут и сопровождаются сосудистой и воспалительной реакцией. В хирургической ране, сформированной скальпелем, в 1-е сутки наблюдалась гиперемия и подъем местной температуры вследствие вазодилатации сосудов, коллатеральный отек, обусловленный повышенной сосудистой проницаемостью. Увеличение внутритканевого давления сопровождается выраженным болевым синдромом, требующим приема обезболивающих препаратов в течение $4,5 \pm 0,5$ сут.

Все пациенты, у которых применяли лазер, отмечали

Таблица 4. Содержание основного фактора роста фибробластов (нг/мг ткани) в слизистой оболочке щеки крыс в динамике заживления раневого дефекта ($M \pm m$)

Воздействие	оФРФ- β	
	эрбиевый лазер	скальпель
День опыта		
1-й	49,5 \pm 9,63	124 \pm 2,07**
2-й	195 \pm 30,6**	89,1 \pm 4,82 *
3-й	90,1 \pm 3,43*	89,2 \pm 4,04*
5-й	65,1 \pm 3,96	85,3 \pm 6,35*
7-й	55,0 \pm 2,45	61,5 \pm 7,80
Контроль	51,3 \pm 4,74	

Примечание. Достоверность различий ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.

безболезненность процедуры, минимальный дискомфорт, удовлетворительное общее состояние во время операции и в последующие дни послеоперационного периода (рис. 5 см. на вкл.). Лазерные операции проходили с меньшей травматизацией и кровопотерей. Работа лазером в бесконтактном режиме или с легким касательным контактом сапфирового фибера с тканью исключала возможность оказывать давление на ткани. В послеоперационном периоде в основном отмечали слабо выраженный болевой синдром на протяжении $2 \pm 0,5$ сут, который не требовал приема обезболивающих препаратов. Вероятно, это связано с меньшей травматизацией тканей и декомпрессией нервных окончаний в области раны.

После операции в зависимости от способа хирургического лечения у пациентов выявлены достоверные различия по срокам и характеру заживления операционной раны. В результате воздействия эрбиевого лазера у пациентов, которым на рану были наложены швы, она зажила первичным натяжением на $5 \pm 0,5$ сут (рис. 6). Послеоперационный рубец через 3 мес представлял собой плоскую тонкую светлую полоску, по чувствительности и эластичности не отличался от окружающих неповрежденных тканей. Через 6 и 12 мес состояние рубца не изменялось. При проведении операции традиционным методом заживление наблюдали через $7,5 \pm 0,5$ сут. Послеоперационный рубец окончательно формировался только к 6 мес.

При операциях скальпелем без наложения швов рана заживала вторичным натяжением с образованием на 3-й день грануляционной ткани под иодоформным тампоном, фиксированным к раневой поверхности швами. К 5-му дню молодая грануляционная ткань полностью покрывала раневую поверхность. С этого времени рану вели открытым способом без иодоформного тампона. Через $14 \pm 0,25$ сут рана покрыта молодой соединительной тканью, так как с прогрессированием раневого заживления грануляционная ткань трансформируется в аваскулярный и бесклеточный коллагеновый матрикс — рубец (см. рис. 6). Через 30 дней при осмотре выявляли начало формирования послеопера-

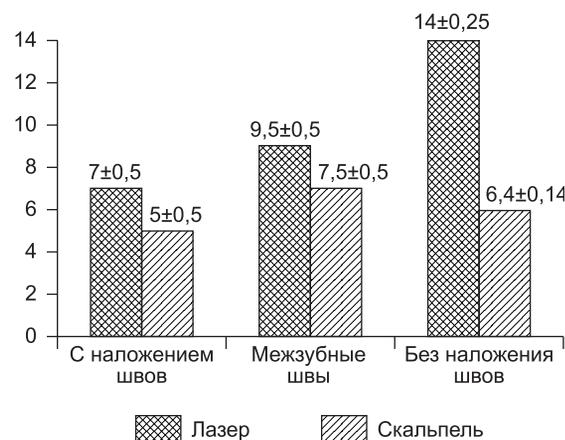


Рис. 6. Сроки заживления послеоперационной раны в зависимости от способа.

ционных рубцов фиброзного характера, которые по мере созревания становились мягкими и эластичными лишь к 6-му месяцу.

При использовании эрбиевого лазера после формирования на ране коагуляционной пленки на следующие сутки она трансформировалась в фибринозную пленку, под которой проходила эпителизация без формирования грануляций по типу *заживления под струпом*. Постепенно зона фибриновой пленки сокращалась, наблюдалась краевая эпителизация, через $6,5 \pm 0,25$ сут — полная. Покрытие раны коагуляционной, а затем фибриновой пленкой обеспечивает достаточную ее гидратацию в период эпителизации, в результате чего имела место более быстрая миграция эпителиальных клеток. При этом не изменялась архитектура восстановленных тканей, а образованный рубец имел эластичную и мягкую консистенцию.

Таблица 5. Показатели смешанной слюны до и после операции оперкулэктомии в динамике заживления раны

Группа	Контрольная	1-я (n = 25)			2-я (n = 27)		
		до операции	после операции		до операции	после операции	
			1-е сутки	3-и сутки		1-е сутки	3-и сутки
СРБ (мг/л)	0	$0,36 \pm 0,02^{**}$	0	0	$0,38 \pm 0,04^{**}$	$0,03 \pm 0,005^{\Delta\Delta\Delta}$	0
Нсу (мкмоль/л)	0	$0,26 \pm 0,07^{**}$	0	0	$0,30 \pm 0,06^{**}$	$0,62 \pm 0,04^{\Delta\Delta\Delta}$	$0,47 \pm 0,09^{\Delta\Delta\Delta}$
ФНОα (пг/мл)	$8,09 \pm 2,42$	$27,3 \pm 4,56^*$	$23,2 \pm 4,29^*$	$7,12 \pm 1,23^{\Delta\Delta}$	$28,2 \pm 5,78^*$	$57,8 \pm 12,6^{\Delta\Delta\Delta}$	$16,3 \pm 4,94^{\Delta\Delta}$
Аннексин V (нг/мл)	$1,50 \pm 0,48$	$2,60 \pm 0,12^*$	$4,11 \pm 0,51^{**}$	$1,81 \pm 0,44^{\Delta\Delta}$	$2,54 \pm 0,37^*$	$4,33 \pm 0,32^{\Delta\Delta\Delta}$	$4,05 \pm 0,65^{\Delta\Delta\Delta}$
α-Дефензины (нг/мл)	$1074 \pm 40,1$	$1136 \pm 12,9^*$	$1097 \pm 26,1$	$1075 \pm 21,2^{\Delta}$	$1133 \pm 16,3^*$	$1101 \pm 48,1$	$1093 \pm 12,6$
Лактоферрин (нг/мл)	$7,54 \pm 0,30$	$36,6 \pm 3,45^{**}$	$14,5 \pm 1,45^{\Delta\Delta\Delta}$	$8,14 \pm 1,20^{\Delta\Delta}$	$40,6 \pm 1,88^{**}$	$18,9 \pm 1,68^{\Delta\Delta\Delta}$	$9,56 \pm 0,35^{\Delta\Delta}$
Ig A (мг/дл)	$425 \pm 87,1$	$388 \pm 45,6^{**}$	$654 \pm 101^{\Delta\Delta\Delta}$	$436 \pm 77,3^{\Delta\Delta}$	$397 \pm 56,7^{**}$	$735 \pm 113^{\Delta\Delta\Delta}$	$613 \pm 91,4^{\Delta\Delta\Delta}$
IgG (мг/дл)	$0,32 \pm 0,05$	$336 \pm 87,4^{**}$	$7,65 \pm 0,43^{\Delta\Delta\Delta}$	$0,41 \pm 0,05^{\Delta\Delta}$	$367 \pm 94,9^{**}$	$304 \pm 23,5^{\Delta\Delta\Delta}$	$26,7 \pm 3,87^{\Delta\Delta\Delta}$
IgM (мг/дл)	$253 \pm 65,8$	$509 \pm 119^*$	$323 \pm 34,7^{\Delta\Delta}$	$245 \pm 56,3^{\Delta}$	$513 \pm 78,1^*$	$359 \pm 66,4^{\Delta\Delta}$	$345 \pm 54,0^{\Delta\Delta}$
оФРФ-β (нг/мл)	$1,32 \pm 0,56$	$0,67 \pm 0,17^*$	$0,96 \pm 0,21^{\Delta\Delta}$	$1,17 \pm 0,05^{\Delta\Delta}$	$0,65 \pm 0,08^*$	$0,72 \pm 0,05^*$	$0,88 \pm 0,07^{\Delta\Delta}$
OPG (пг/мл)	$0,28 \pm 0,05$	$0,94 \pm 0,06^{**}$	$0,78 \pm 0,06^{\Delta\Delta\Delta}$	$0,32 \pm 0,03^{\Delta\Delta}$	$0,88 \pm 0,05^{**}$	0	$0,09 \pm 0,002^{\Delta\Delta\Delta}$
sRANKL (пмоль/л)	0	$1,58 \pm 0,23^{**}$	0	0	$1,63 \pm 0,43^{**}$	$29,1 \pm 9,87^{\Delta\Delta\Delta}$	$1,13 \pm 0,22^{\Delta\Delta\Delta}$

Примечание. Достоверность различий при $*p < 0,05$; $**p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой $^{\Delta}p < 0,05$; $^{\Delta\Delta}p < 0,001$ по сравнению с исходными данными.

Таблица 6. Показатели иммунного статуса полости рта пациентов с воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области в динамике лечения

Параметры	До операции	3-и сутки		7-е сутки		30-е сутки		Норма
		лазер	традиц.	лазер	традиц.	лазер	традиц.	
S-IgA, мг% (слюна)	21,4 ± 2,0	34,0 ± 2,0*	14,0 ± 1,0**	36,0 ± 2,0*	19,4 ± 1,5*	28,0 ± 2,5	22,0 ± 2,0	26,5 ± 2,6
IgG мг% (слюна)	14,0 ± 1,5	13,0 ± 1,2	15,6 ± 1,2	13,2 ± 1,1	14,1 ± 1,1	12,7 ± 1,0	13,0 ± 1,2	13,1 ± 1,1
IgA, мг% (слюна)	12,6 ± 1,1	11,0 ± 1,1	15,0 ± 1,1	10,1 ± 1,0	12,8 ± 1,6	10,4 ± 1,0	11,5 ± 1,0	10,2 ± 1,1
Лимфоциты (смыв), %	1,2 ± 0,1**	6,1 ± 0,3**	0,5 ± 0,03**	4,0 ± 0,2**	1,0 ± 0,07**	2,1 ± 0,1**	1,2 ± 0,09*	2,0 ± 0,1
ФИ, %	68,0 ± 6,0	86,0 ± 5,0	50,3 ± 4,1**	88,0 ± 6,0	52,0 ± 4,0**	86,0 ± 7,0	67,0 ± 5,0	76,0 ± 5,1
ФЧ	6,7 ± 0,5	10,3 ± 1,0*	4,0 ± 0,4**	11,0 ± 1,0**	7,1 ± 0,6	9,0 ± 0,7	7,5 ± 0,7	8,1 ± 0,6
EN-PO, %	53,0 ± 4,0	59,2 ± 5,0	41,0 ± 1,9**	61,4 ± 6,0	52,0 ± 2,0	58,0 ± 4,0	53,1 ± 3,0	58,2 ± 4,0
ДРОН, %	31,0 ± 1,5	36,0 ± 2,0	27,0 ± 1,5*	40,0 ± 3,0*	32,0 ± 1,3	39,0 ± 2,0	33,0 ± 2,0	32,5 ± 1,7
S-IgA/IgG	1,5 ± 0,009**	2,6 ± 0,20**	0,90 ± 0,07**	2,70 ± 0,20**	1,40 ± 0,06**	2,20 ± 0,15	1,70 ± 0,10*	2,0 ± 0,1
S-IgA/IgA	1,65 ± 0,15**	3,00 ± 0,25	0,93 ± 0,07**	3,56 ± 0,30**	1,5 ± 0,10**	2,69 ± 0,20	1,90 ± 0,11**	2,6 ± 0,15
IgG/ФЧ	2,1 ± 0,15*	1,26 ± 0,1	3,9 ± 0,3**	1,2 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,4 ± 0,15	1,7 ± 0,1**	1,6 ± 0,1

Примечание. Достоверность различий при ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ до и после операции.

Мы предположили, что подробное раскрытие механизмов заживления раны после повреждения путем использования лабораторных методов исследования жидкостей полости рта, которые содержат продукты раневого транссудата, позволит переключиться с эмпирических подходов на доказательные. В качестве исследовательской модели нами использована смешанная слюна и смывы со слизистой оболочки полости рта. Смешанная слюна, выделяясь из секреторных отделов малых и больших слюнных желез, поддерживает гомеостаз тканей полости рта, поэтому в смешанной слюне пациентов изучены изменения в содержании ряда белков, участвующих в местных воспалительных, антибактериальных и иммунных ответах, которые отражают не только патологическое состояние тканей, но и их реакцию в ответ на хирургическое вмешательство.

Анализ показателей биологических жидкостей пациентов с заболеваниями челюстно-лицевой области после хирургического лечения также показал преимущества лазерных технологий лечения. Проводимое комплексное хирургическое лечение хронического генерализованного пародонтита средней степени с использованием излучения эрбиевого лазера способствует стабилизации мембран клеток пародонта после повреждения, о чем свидетельствует снижение через 6 мес количества Cu/Zn-СОД и активности общей СОД в слюне до значений лиц контрольной группы.

Применение лазерных технологий для хирургического лечения воспалительных заболеваний обеспечивает противовоспалительное действие и восстановление защитных систем полости рта, выражающееся в исчезновении в смешанной слюне С-реактивного белка, гомоцистеина, нормализации количества фактора роста фибробластов- β , аннексина V, ФНО α , α -дефензинов, лактоферрина, IgA, G и M (табл. 5). Степень развития локальной воспалительной реакции в полости рта отражает содержание ФНО α , который участвует не только в защитных реакциях, но и в процессах деструкции и репарации, сопутствующих воспалению. Использование эрбиевого лазера приводило к снижению содержания ФНО α в слюне уже на 1-е сутки регенерации раны, а на 3-и сутки не отличалось от значений контрольной группы. При применении стандартных хирургических инструментов уровень ФНО α в слюне оставался достоверно высоким, что свидетельствует о сохраняющемся воспалении. ФНО α также активно участвует в резорбции кости.

Также маркером воспалительной реакции является С-реактивный белок, который в слюне в норме не выявлялся. Однако у пациентов, которым иссекали нависающую слизистую оболочку скальпелем, содержание С-реактивного белка в слюне сохранялось до 3 сут.

Информативным показателем деструкции костной ткани пародонта в смешанной слюне является исследование содержания остеопротегерина (OPG) и растворимого рецептора лиганда ядерного фактора каппа В (sRANKL). При развитии патологического пути регенерации в пародонте возникает дисбаланс в остеокласт/остеобласт-активирующей системе, которая в норме обеспечивает процесс ремоделирования костной ткани. Согласно полученным нами данным, в норме в слюне не определяется содержание sRANKL, но развитие перикоронита сопровождается появлением в смешанной слюне sRANKL и повышением содержания OPG. Оперкулезомия с использованием эрбиевого лазера в динамике заживления раны приводила к исчезновению в смешанной слюне пациентов sRANKL и снижению количества OPG до значений контрольной группы. Использование режущего инструмента характеризовалось процессами, смещенными в сторону резорбции костной ткани альвеолярного отростка, проявляясь в повышенном количестве sRANKL. Известно, что на синтез sRANKL влияют клетки моноцит-макрофагальной линии, которые инициируют синтез mPNC sRANKL в остеокластах и подавляют синтез mPNC OPG в остеобластах.

Нами изучены лазериндуцированные изменения общего и местного иммунитета при воздействии эрбиевого лазера на ткани полости рта. После традиционного хирургического лечения пациентов с воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области популяционный состав лейкоцитов в периферической крови изменился в сторону снижения относительного числа нейтрофилов, индекса интоксикации и увеличения относительного количества лимфоцитов, что указывает на уменьшение активности воспалительного процесса и иммунодефицита. Показатели местной реактивности в полости рта не достигают нормальных величин, что создает возможность развития послеоперационных осложнений. По нашим данным, применение излучения эрбиевого лазера нормализует секреторные, гуморальные и клеточные факторы местной защиты и полностью восстанавливает нарушенные между ними взаимосвязи. Популяционный состав

лейкоцитов в периферической крови указывает на стихание фазы воспаления и соответственно развитие интоксикации и иммунодефицита. Отмечается также лазериндуцированная стимуляция ЭБ- и fас-рецепторов нейтрофилов, что стимулирует фагоцитарный процесс выше нормальных показателей. После воздействия эрбиевого лазера наблюдается приток в полость рта из крови иммунокомпетентных В-лимфоцитов, а также стимуляция продукции S-компонента эпителиальными клетками слизистой оболочки полости рта, что приводит к увеличению количества секреторного иммуноглобулина А (табл. 6).

Таким образом, по нашим данным, наилучшие результаты получены у пациентов, у которых для хирургического лечения заболеваний челюстно-лицевой области использовали лазерные технологии. Удобство клинического применения, атравматичность, обезболивающий и гемостатический эффект, регенерирующее действие и улучшение микроциркуляции позволило сократить время оперативного вмешательства и сроки заживления. Излучение эрбиевого лазера восстанавливает структуру клеточных мембран тканей полости рта в более короткие сроки, усиливает местной тканевой иммунитет и ангиогенез, стимулирует регенерацию всех тканей пародонта, включая и костную.

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Агапов В.С., Арутюнов С.Д., Шулаков В.В. *Инфекционные воспалительные заболевания челюстно-лицевой области. Учебное пособие.* М.; 2004: 56—7.
- Губайдулина Ж.Я., Цигельник Л.Н., Лузина В.В. Опыт лечения больных с обширными кистами челюстей. *Стоматология.* 2007; 1: 84—6.
- Дробышев А.Ю., Тарасенко С.В., Гемонов В.В., Тарасенко И.В. Исследование регенерации костной ткани после лазерного и механического воздействия (в эксперименте). *Кафедра.* 2007; 6 (2): 53—7.
- Raulin C., Grema H. Single-pass carbon dioxide laser skin resurfacing combined with cold-air cooling: efficacy and patient satisfaction of a prospective side-by-side study. *Arch. Dermatol.* 2004; 140 (11): 1333—6.
- Рисованный С.И., Рисованная О.Н., Масычев В.И. *Лазерная стоматология.* Краснодар: Кубань-Книга; 2005.
- Coluzzi D.J., Convissar R.A. *Atlas of laser applications in dentistry.* Quintessence Publishing. Canada. 2007.
- Серов В.В., Шехтер А.Б. *Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология).* М.: Медицина, 1981.
- Moody B.R., McCarthy J.E., Hruza G.J. Collagen remodeling after 585-nm pulsed dye laser irradiation: an ultrasonographic analysis. *Dermatol Surg.* 2003; 29 (10): 997—9.
- Вавилова Т.П. *Биохимия тканей и жидкостей полости рта: учебное пособие.* М: ГЭОТАР-Медиа; 2008: 67, 159.
- Kato T., Imatani T., Minaguchi K. et al. Salivary cystatins induce interleukin-6 expression via cell surface molecules in human gingival fibroblasts. *Mol. Immun.* 2002; 39, Iss. 7—8: 423—30.
- Патологическая физиология. Под ред. Воложина А.И., Порядина Г.В.М.: МЕДпресс; 1998: 101—45.

REFERENCES

- Agapov V.S., Arutyunov S.D., Shulakov V.V. *Infectious Inflammatory Diseases of Maxillofacial Area. Training Manual. [Infektsionnye vospalitel'nye zabolevaniya chelyustno-litsevoy oblasti. Uchebnoe posobie].* Moscow; 2004: 56—7.
- Gubaydulina Zh. Ya., Tsigel'nik L.N., Luzina V.V. Experience in the treatment of patients with large cysts of the jaws. *Stomatologiya.* 2007; 1: 84—6.
- Drobyshev A.Yu., Tarasenko S.V., Gemonov V.V., Tarasenko I.V. Study of regeneration of bone tissue after laser and mechanical effects (in experiment). *Kafedra.* 2007; 6 (2): 53—7.
- Raulin C., Grema H. Single-pass carbon dioxide laser skin resurfacing combined with cold-air cooling: efficacy and patient satisfaction of a prospective side-by-side study. *Arch. Dermatol.* 2004; 140 (11): 1333—6.
- Risovanny S.I., Risovannaya O.N., Masychev V.I. *Laser Dentistry. [Lazernaya stomatologiya].* Krasnodar: Kuban-Kniga; 2005.
- Coluzzi D.J., Convissar R.A. *Atlas of laser applications in dentistry.* Quintessence Publishing. Canada. 2007.
- Serov V.V., Shekhter A.B. *Connective Tissue (Functional Morphology and General Pathology). [Soedinitel'naya tkan' (funktsional'naya morfologiya i obshchaya patologiya)].* Moscow: Meditsina; 1981.
- Moody B.R., McCarthy J.E., Hruza G.J. Collagen remodeling after 585-nm pulsed dye laser irradiation: an ultrasonographic analysis. *Dermatol Surg.* 2003; 29 (10): 997—9.
- Vavilova T.P. *Biochemistry of Tissues and Fluids of the Oral Cavity: a Training Manual. [Biokhimiya tkaney i zhidkostey polosti рта: uchebnoe posobie].* Moscow: GEOTAR-Media; 2008: 67, 159.
- Kato T., Imatani T., Minaguchi K. et al. Salivary cystatins induce interleukin-6 expression via cell surface molecules in human gingival fibroblasts. *Mol. Immun.* 2002; 39, Iss. 7—8: 423—30.
- Pathological Physiology. [Patologicheskaya fiziologiya].* Ed.: A.I. Volozhin, Poryadin G.V. Moscow: Medpress; 1998: 101—45.

Поступила 01.11.15

Принята в печать 28.12.15

К ст. Поповой Е.А. и соавт.

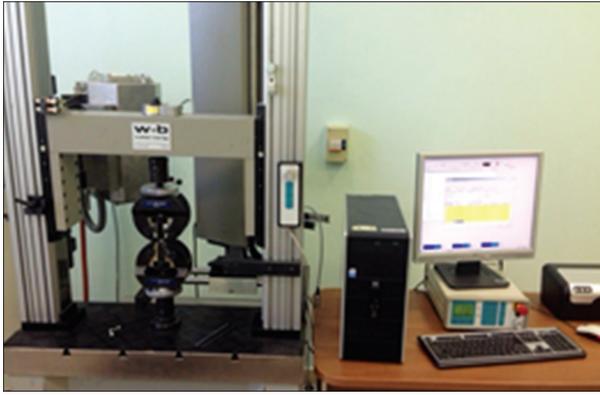


Рис. 1. Универсальная разрывная машина LFM 400 kN.

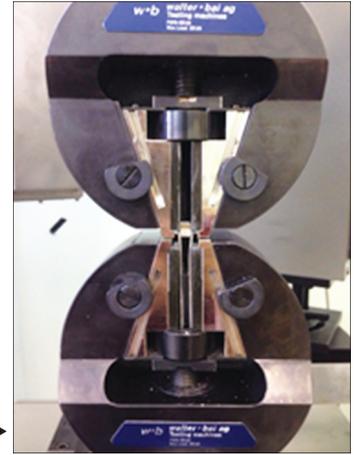
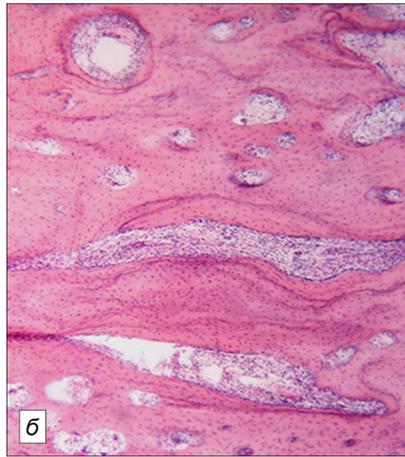
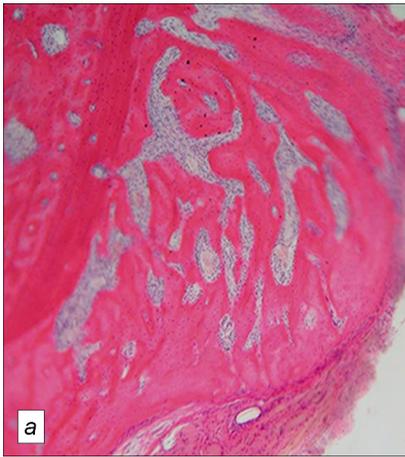


Рис. 2. Образец в креплениях испытательной машины.



К ст. Тарасенко С.В. и соавт.

Рис. 1. 40-е сутки после нанесения травмы: а – с помощью физиодиспенсера; б – лазерным излучением. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10. Об. 10.

Рис. 4. Дефект слизистой оболочки крыс через 15 сут после нанесения: а – эрбиевым лазером; б – скальпелем. Окраска гематоксилином и эозином, Ув. × 200.

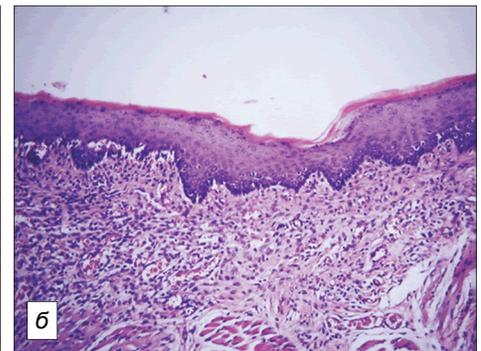
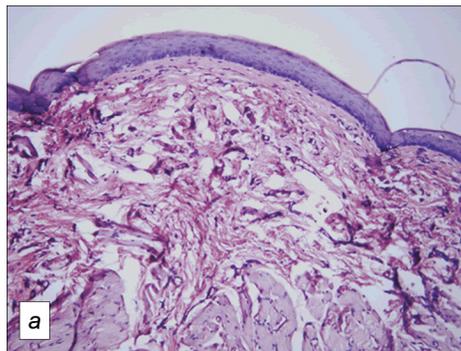


Рис. 5. Лазерное иссечение участков пораженной веррукозной формой лейкоплакии слизистой оболочки нижней поверхности языка: а – вид до операции; б – рана полностью эпителизирована после операции.



К ст. Аракелян М.Г. и соавт.

Рис. 1. Проявления ксеростомии при болезни Шегрена. Складчатый язык с атрофированными сосочками.