

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Александров М.Т., Дмитриева Е.Ф., Ахмедов А.Н., Артемова О.А., Потривайло А., Прикуле Д.В.

РАМАН-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ АНАТОМО-ТОПОГРАФИЧЕСКИХ ЗОН ЗУБОВ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), 119146, г. Москва

Цель исследования — изучить состояние минерализации различных анатомо-топографических зон зубов для различных функциональных групп и обосновать ее клиническую целесообразность. В доклиническом исследовании in vitro на 20 модельных тест-объектах зубов (резцы, клыки, премоляры и маляры), удаленных по клиническим показаниям, проводили раман-флуоресцентное исследование степени минерализации различных анатомо-топографических зон зуба у различных функциональных групп зубов. Использовали АПК Инспектор М с длиной волны зондирующего излучения 532 нм. Преимуществами раман-флуоресцентной спектроскопии для определения степени минерализации твердых тканей зуба являются объективность (цифровая технология), экспрессность, неинвазивность, простой и неразрушающий контроль степени минерализации/реминерализации твердых тканей зуба, возможность документирования и хранения информации. В процессе исследования проведен качественный и количественный анализ минерализации различных анатомо-топографических зон зубов для различных функциональных групп зубов. Высокая чувствительность и воспроизводимость метода позволили выявить существенные различия минерализации эмали зуба в области режущего края, экватора и шейки зуба. Показано, что эти различия проявляются и у других функциональных групп зубов ($p < 0,05$).

К л ю ч е в ы е с л о в а: эмаль; реминерализация; анатомо-топографическая зона; раман-флуоресцентная спектроскопия.

Для цитирования: Александров М.Т., Дмитриева Е.Ф., Ахмедов А.Н., Артемова О.А., Потривайло А., Прикуле Д.В. Раман-флуоресцентные характеристики различных анатомо-топографических зон зубов различных функциональных групп. Российский стоматологический журнал. 2019; 23 (5): 188-191. <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2019-23-5-188-191>

Alexandrov M.T., Dmitrieva E.F., Akhmedov A.N., Artemova O.A., Potrivailo A., Prikule D.V.

RAMAN-FLUORESCENT CHARACTERISTICS OF DIFFERENT ANATOMICAL AND TOPOGRAPHIC ZONES OF TEETH OF DIFFERENT FUNCTIONAL GROUPS

I.M. Sechenov First MGPU (Sechenovskiy Universitet), 119146, Moscow

The aim of the study is to study the state of mineralization of various anatomical and topographic zones of teeth for different functional groups and to justify its clinical feasibility. In a preclinical in vitro study on 20 model test objects of teeth (incisors, canines, premolars and painters), removed according to clinical indications, Raman-fluorescent study of the degree of mineralization of various anatomical and topographic zones of the tooth in different functional groups of teeth was carried out. Used APC Inspector M with a wavelength of 532 nm probing radiation. The advantages of Raman fluorescence spectroscopy for determining the degree of mineralization of hard tooth tissues are objectivity (digital technology), expressiveness, non-invasiveness, simple and non-destructive control of the degree of mineralization/remineralization of hard tooth tissues, the ability to document and store information. In the course of the study, a qualitative and quantitative analysis of the mineralization of various anatomical and topographic zones of teeth for different functional groups of teeth was carried out. High sensitivity and reproducibility of the method allowed to reveal significant differences in mineralization of tooth enamel in the area of the cutting edge, equator and neck of the tooth. It is shown that these differences are manifested in other functional groups of teeth ($p < 0.05$).

К e y o r d s: enamel; remineralization; anatomical and topografichesky area; Raman-fluorescence spectroscopy.

For citation: Alexandrov M.T., Dmitrieva E.F., Akhmedov A.N., Artemova O.A., Potrivailo A., Prikule D.V. Raman-fluorescent characteristics of different anatomical and topographic zones of teeth of different functional groups. Rossiyskii stomatologicheskii zhurnal. 2019; 23(5): 188-191. <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2019-23-5-188-191>

For correspondence: Aleksandrov Mikhail Timofeevich, MD, professor, E-mail: alex_mta@mail.ru

Acknowledgements. The study had no sponsorship.

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

Received 06.09.2019

Accepted 16.10.2019

Введение

Зубная эмаль — самая минерализованная ткань организма. Ее состав — 96—98 мас.% неорганических веществ, 2—4 мас.% органических веществ и воды.

В настоящее время методы лазерной раман-флуоресцентной спектроскопии, их технологическая и аппаратная реализация играют все большую роль в медицине [1—6]. В стоматологии проводятся как экспериментальные, так и клинические исследования возможностей средств квантовой электроники, как источников лазерного излучения для диагностики, профилактики и лечения заболеваний твердых тканей зубов. При этом на первый план выходят задачи идентификации и характеристики органических и неорганических молекул, включая мониторинг их структурных изменений, измерение концентраций веществ, входящих в состав пробы. В частности, в исследовании S. Yang и других авторов [7—10] отмечено, что на основе использования рамановской спектроскопии можно оценить минерализацию твердых тканей зуба. В своей работе [7] зуб с кариесом эмали сравнивали с интактными его участками при волновых числах 960 и 880 см⁻¹, соответствующих (PO₄)³⁻ и (CO₃)²⁻. Выявлено, что разница между интактным участком зуба и зоной кариеса одного и того же зуба имеет четко выраженные спектральные различия на указанных длинах волн, что позволило авторам с высокой степенью чувствительности дифференцировать указанную патологию с инфарктной тканью.

Ionita I. [11], используя рамановскую технологию, подтвердил, что минерализация эмали меняется с возрастом [12]. Кроме того, автором выявлено, что нарушение гигиенического состояния твердых тканей зуба приводит к нарушению степени его минерализации.

Следует отметить, что в литературе не представлены раман-флуоресцентные технологии, позволяющие в реальном масштабе времени одновременно оценивать как гигиеническое состояние твердых тканей зуба, так и степень их минерализации. При этом не изучен такой клинически важный аспект, как распределение минерализации в различных анатомо-топографических зонах зуба — режущий край, жевательная поверхность, экватор, шейка зуба.

Цель нашего исследования — методом раман-флуоресцентной спектроскопии изучить минерализацию различных анатомо-топографических зон эмали зуба и определить ее клиническое значение.

Материал и методы

В настоящем доклиническом исследовании *in vitro* на модельных тест-объектах зубов, удаленных по клиническим показаниям (резцы, клыки, премоляры, моляры), проводили оценку минерализации различных анатомо-топографических зон указанных зубов, используя лазерный аппаратно-программный

комплекс раман-флуоресцентной диагностики «Ин-Спектр М» с длиной волны зондирующего излучения 532 нм. Исследование выполняли на основе предварительных экспериментов *in vitro*, где объективно показано, что рамановские спектры зубов (эмаль зуба) адекватны показателям эталонного образца гидроксилпатита — линия ГАП. Данный результат определил выбор методики для решения цели и задач исследования.

С помощью АПК «ИнСпектр М» тест-объекты (эмаль, дентин, цемент исследуемых зубов) подвергали воздействию лазерного излучения видимого диапазона. Одновременно собирали и обрабатывали полученную информацию. Объект (зуб) измеряли в контактно-стабильном положении к источнику излучения. Каждое спектральное измерение соответствовало M_{ср} из пятисот измерений, при длительности одного измерения — 100 мкс (на основании отработанного в эксперименте времени накопления сигнала, необходимого для его визуализации и измерения). Общее время одного измерения соответствовало 2,5—3 мин. Всего в доклиническом исследовании использовали 20 тест-объектов зубов по 5 из каждой функциональной группы (5 резцов, 5 клыков, 5 премоляров, 5 моляров), удаленных по клиническим показаниям.

Для количественной оценки интенсивности рамановского излучения на длине волны гидроксилпатита-963 см⁻¹ (в относительных единицах) измеряли его показатели в максимуме и минимуме спектральной мощности. Полученную разницу (отн. ед.) принимали за интенсивность Рамана для эмали исследуемых зубов (M ср.).

Результаты исследования

Из табл. 1 следует, что распределение степени минерализации твердых тканей зуба по убывающей характеризуется следующим образом: экватор (M ср.) 3081 отн. ед., режущий край (M ср.) 3058 отн. ед., пришеечная область (M ср.) 2992 отн. ед.

Из табл. 2 следует, что распределение степени минерализации твердых тканей зуба по убывающей характеризуется следующим образом: экватор (M ср.) 5791 отн. ед., режущий край (M ср.) 4679 отн. ед., пришеечная область (M ср.) 2662 отн. ед.

Из табл. 3 следует, что распределение степени минерализации твердых тканей зуба по убывающей ха-

Таблица 1. Спектральные характеристики эмали зуба (резцы)

Объект исследования (резцы), N=5	Верхний пик (интенсивность сигнала в максимуме/длина волны в максимуме)	Нижний уровень (интенсивность сигнала в минимуме/длина волны в минимуме)	Интенсивность Рамана, отн. ед. (M ср.)
Режущий край	y = 11134, x = 963 см ⁻¹	y = 8079, x = 963 см ⁻¹	y = 3058, x = 963 см ⁻¹
Экватор	y = 12644, x = 963 см ⁻¹	y = 8843, x = 963 см ⁻¹	y = 3801, x = 963 см ⁻¹
Пришеечная область вестибулярная поверхность	y = 9867, x = 963 см ⁻¹	y = 6875, x = 963 см ⁻¹	y = 2992, x = 963 см ⁻¹

Экспериментально-теоретические исследования

Таблица 2. Спектральные характеристики эмали зуба (клыки)

Объект исследования (клыки), N = 5	Верхний пик (интенсивность сигнала в максимуме/длина волны в максимуме)	Нижний уровень (интенсивность сигнала в минимуме/длина волны в максимуме)	Интенсивность Рамана, отн. ед. (М ср.)
Режущий край	y = 13253, x = 963 см ⁻¹	y = 8574, x = 963 см ⁻¹	y = 4679, x = 963 см ⁻¹
Экватор	y = 14387, x = 963 см ⁻¹	y = 8596, x = 963 см ⁻¹	y = 5791, x = 963 см ⁻¹
Пришеечная область вестибулярная поверхность	y = 11098, x = 963 см ⁻¹	y = 8436, x = 963 см ⁻¹	y = 2662, x = 963 см ⁻¹

рактируется следующим образом: экватор (М ср.) 4501 отн. ед., окклюзионная поверхность (М ср.) 2911 отн. ед., пришеечная область (М ср.) 2499 отн. ед.

Из табл. 4 следует, что распределение степени минерализации твердых тканей зуба по убывающей характеризуется следующим образом: экватор (М ср.) 3511 отн. ед., окклюзионная поверхность (М ср.) 1898 отн. ед., пришеечная область (М ср.) 1113 отн. ед.

Заключение

Из представленных в табл. 1—4 данных видно, что в различных анатомо-топографических зонах (режущий край, жевательная поверхность, экватор, шейка зуба) во всех группах зубов (резцы, клыки, премоляры, моляры) отмечается наибольшая степень минерализации твердых тканей зуба в области экватора, чуть в меньшей степени — в области режущего края и окклюзионной поверхности и наименьшая степень в пришеечной области. Полученные данные согласуются с литературными о иммунных зонах зуба, к которым относятся бугры, режущий край и экватор. Так, по данным [13], установлено, что имеются поверхности или участки зуба, которые поражаются чаще других. Автором показано, что на больших и малых коренных зубах раньше других поражаются фиссуры жевательных поверхностей и слепые ямки. Выявлено, что частота поражения кариесом разных зубов неодинакова: зубы верхней челюсти поражаются чаще, чем зубы нижней челюсти. Резцы и клыки поражаются кариесом значительно реже, чем малые и большие коренные зубы. Наши данные более объективно и конкретно уточняют результаты, представленные другими исследователями.

Таблица 3. Спектральные характеристики эмали зуба (премоляры)

Объект исследования n = 5 (премоляры)	Верхний пик (интенсивность сигнала в максимуме/длина волны в максимуме)	Нижний уровень (интенсивность сигнала в минимуме/длина волны в максимуме)	Интенсивность Рамана(относительные единицы (М ср.)
Окклюзионная поверхность	y = 12487, x = 963 см ⁻¹	y = 9576, x = 963 см ⁻¹	y = 2911, x = 963 см ⁻¹
Экватор	y = 14376, x = 963 см ⁻¹	y = 9875, x = 963 см ⁻¹	y = 4501, x = 963 см ⁻¹
Пришеечная область вестибулярная поверхность	y = 10956, x = 963 см ⁻¹	y = 8457, x = 963 см ⁻¹	y = 2499, x = 963 см ⁻¹

Таблица 4. Спектральные характеристики эмали зуба (моляры)

Объект исследования моляр, n = 5	Верхний пик (интенсивность сигнала в максимуме/длина волны в максимуме)	Нижний уровень (интенсивность сигнала в минимуме/длина волны в максимуме).	Интенсивность Рамана, отн. ед. (М ср.)
Окклюзионная поверхность	y = 17865, x = 963 см ⁻¹	y = 15967, x = 963 см ⁻¹	y = 1898, x = 963 см ⁻¹
Экватор	y = 17840, x = 963 см ⁻¹	y = 14329, x = 963 см ⁻¹	y = 3511, x = 963 см ⁻¹
Пришеечная область вестибулярная поверхность	y = 15439, x = 963 см ⁻¹	y = 14326, x = 963 см ⁻¹	y = 1113, x = 963 см ⁻¹

Неодинаковая минерализация различных функциональных групп зубов показала, что наибольшая степень минерализации, которую отмечали в области режущего края, экватора и пришеечной области, наблюдается у клыков и резцов, меньшая степень минерализации отмечается у жевательной группы зубов (премоляры, моляры) в области окклюзионной поверхности и пришеечной области, однако в области экватора близка к показателям фронтальной группы зубов.

Результаты эксперимента свидетельствуют об экспрессности и информативности метода Рамановской спектроскопии для изучения структурных особенностей твердых тканей зубов, а также являются наиболее точными для анализа органических веществ. Последнее подтверждено и работами других авторов [1416]. Несомненные плюсы этой перспективной медицинской технологии — экспрессность, компактность и портативность используемой аппаратуры, высокая разрешающая способность порядка 1А, чувствительность и воспроизводимость методов измерения, малая погрешность измерения, возможность использования микрообъемов материала и отсутствием разрушений после анализа. Данная методика может быть использована в клинических условиях после соответствующей сертификации, отработки клинического алгоритма работы, что является новым и перспективным для стоматологии и может найти широкое применение при диагностике и лечении кариеса, поражении твердых тканей зуба некариозного происхождения, проведении реминерализующей терапии, оценке ее клинической эффективности при различных патологических процессах (при действии физических, химических и биологических факторов на твердые ткани зуба).

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Huser T. Nanosensors using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). Center for Biophotonics Science and Technology; EAD289: 2007.
2. Александров М.Т., Маргарян Э.Г. Применение лазерных технологий в клинике терапевтической стоматологии (обоснование, возможности, перспективы). *Российская стоматология*. 2017; 3: 31—6.

3. Александров М.Т., Пашков Е.П., Баграмова Г.Э., Кукушкин В.И., Маргарян Э.Г. Возможности и перспективы применения раман-флюоресцентной диагностики в стоматологии. *Российский стоматологический журнал*. 2018; 22(1): 4—11.
4. Kukushkin I.V. "Raman spectroscopy of collective excitations", *International Conference on Application of High Magnetic Field in Semiconductor Physics, HMFSP-18, 31 July — 5 August 2010, Fukuoka, Japan*, Proceedings. 2010; 49.
5. Kukushkin I.V. "Rotons in the dispersion of collective excitations studied by Raman technique", *International Conference "The Quantum Hall Effect"*, 2—4 May 2010, Minneapolis, USA, Proceedings. 2010; 39.
6. Kulik L.V., Zhuravlev A.S. "Resonant Raman scattering as a probe of electron spin polarization", *20th International Conference on High Magnetic Fields in Semiconductor Physics July 22—27 2012, Chamonix, France*, Proceedings. 2012; 131.
7. Yang S., Li B., Akkus A., Akkus O., Lang L. *Wide-Field Raman Imaging of Dental Lesions School of Dental Medicine (Case Western Reserve University)*. Cleveland: OH, 44106, USA. Raman Spectroscopy).
8. Pezzotti G. Raman piezo-spectroscopic analysis of natural and synthetic biomaterials. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005; 381: 577—90.
9. Kirchner M.T., Edwards H.G.M., Lucy D., Pollard A.M. Ancient and modern specimens of human teeth: A Fourier transform Raman spectroscopic study. *J. Raman Spectros.* 1997; 28: 171—8.
10. Boskey A.L., Mendelsohn R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissue. *Vib. Spectros.* 2005; 38: 107—14.
11. Ionita I. Diagnosis of tooth decay using polarized micro-Raman confocal spectroscopy. *Rom. Rep. Phys.* 2009; 61: 567—74.
12. Ager J.W., Nalla R.K., Breeden K.L., Ritchie R.O. Deep-ultraviolet Raman spectroscopy study of the effect of aging on human cortical bone. *J. Biomed. Optic.*, 2005; 10: 034012.
13. Максимовский Ю.М., Ульянова Т.В., Гринин В.М. и др. *Кариец зубов [Электронный ресурс]* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
14. Kneipp K., Kneipp H., Itzkan I., Dasari R., Feld M. Surface enhanced Raman scattering and biophysics. *J. Phys. Condensed Matter*. 2002;14: R597-R624. <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970408643.html>
15. Sheng R., Nii F., Cotton T. Determination of pu-rine bases by reversed-phase high-performance liquid chromatography using real-time surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* 1991; 63: 437.
16. Thornton J., Force R. *Appl. Spectrosc.* 1991; 45: 1522.
2. Alexandrov M.T., Margaryan E.G. application of laser technologies in the clinic of therapeutic dentistry (justification, opportunities, prospects). *Rossiyskaya stomatologiya*. 2017; 3: 31—6. (in Russian)
3. Alexandrov M.T., Pashkov E.P., Bagramova G.E., Kukushkin V.I., Margaryan E.G. Possibilities and prospects of application of Raman-fluorescent diagnostics in dentistry. *Rossiyskiy stomatologicheskiy zhurnal*. 2018; 22(1): 4—11. (in Russian)
4. Kukushkin I.V. "Raman spectroscopy of collective excitations", *International Conference on Application of High Magnetic Field in Semiconductor Physics, HMFSP-18, 31 July — 5 August 2010, Fukuoka, Japan*, Proceedings. 2010; 49.
5. Kukushkin I.V. "Rotons in the dispersion of collective excitations studied by Raman technique", *International Conference "The Quantum Hall Effect"*, 2—4 May 2010, Minneapolis, USA, Proceedings. 2010; 39.
6. Kulik L.V., Zhuravlev A.S. "Resonant Raman scattering as a probe of electron spin polarization", *20th International Conference on High Magnetic Fields in Semiconductor Physics July 22—27 2012, Chamonix, France*, Proceedings. 2012; 131.
7. Yang S., Li B., Akkus A., Akkus O., Lang L. *Wide-Field Raman Imaging of Dental Lesions School of Dental Medicine (Case Western Reserve University)*. Cleveland: OH, 44106, USA. Raman Spectroscopy).
8. Pezzotti G. Raman piezo-spectroscopic analysis of natural and synthetic biomaterials. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005; 381: 577—90.
9. Kirchner M.T., Edwards H.G.M., Lucy D., Pollard A.M. Ancient and modern specimens of human teeth: A Fourier transform Raman spectroscopic study. *J. Raman Spectros.* 1997; 28: 171—8.
10. Boskey A.L., Mendelsohn R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissue. *Vib. Spectros.* 2005; 38: 107—14.
11. Ionita I. Diagnosis of tooth decay using polarized micro-Raman confocal spectroscopy. *Rom. Rep. Phys.* 2009; 61: 567—74.
12. Ager J.W., Nalla R.K., Breeden K.L., Ritchie R.O. Deep-ultraviolet Raman spectroscopy study of the effect of aging on human cortical bone. *J. Biomed. Optic.*, 2005; 10: 034012.
13. Maksimovskiy Yu.M., Ulyanova T.V., Grinin V.M. et al. *Dental Caries (Electronic resource). [Karies zubov (Elektronnyy resurs)]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
14. Kneipp K., Kneipp H., Itzkan I., Dasari R., Feld M. Surface enhanced Raman scattering and biophysics. *J. Phys. Condensed Matter*. 2002;14: R597-R624. <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970408643.html>
15. Sheng R., Nii F., Cotton T. Determination of pu-rine bases by reversed-phase high-performance liquid chromatography using real-time surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* 1991; 63: 437.
16. Thornton J., Force R. *Appl. Spectrosc.* 1991; 45: 1522.

REFERENCES

1. Huser T. Nanosensors using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). Center for Biophotonics Science and Technology; EAD289: 2007.